Aus dem
Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. H. T. Brüster

Untersuchungen von Qualitätskontrollplasmen für Blutgerinnungsanalysen

Dissertation
zur Erlangung eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Detlef Gebhardt

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538105_0018

Aus dem

Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin

Direktor:

Prof. Dr. med. H. T. Brüster

UNTERSUCHUNGEN VON QUALITÄTSKONTROLLPLASMEN FÜR BLUTGERINNUNGSANALYSEN

Dissertation

zur Erlangung eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Detlef Gebhardt

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. H. T. Brüster

Referent:
gez.:
Prof. Dr. H. Trobisch

Korreferent:
gez.:
Priv.-Doz. Dr. O. Richter

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Bedeutung der Qualitätskontrolle in der Klinischen Chemie	1
1.2.	Prinzipien, Methoden und Begriffe der Qualitätskontrolle in der Klinischen Chemie	2
1.3.	Probleme der Qualitätskontrolle in der Hämostaseologie	5
1.4.	Aufgabenstellung	7
2.	MATERIALIEN	8
2.1.	Untersuchte Kontrollplasmen	8
2.2.	Benutzte Geräte und Materialien	13
3.	METHODEN	17
3.1.	Gerinnungsanalysen	17
3.1. 1.	Bestimmung der Einphasen-Thromboplastingerinnungszeit nach Quick (Quick-Wert)	17
3.1. 2.	Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT)	19
3.1. 3.	Bestimmung der Plasma-Thrombin-Gerinnungszeit (Thrombinzeit)	20
3.1. 4.	Bestimmung der Aktivität des Faktors II im Einphasentest	20
3.1. 5.	Bestimmung der Aktivität des Faktors V im Einphasentest	22
3.1. 6.	Bestimmung der Aktivität des Faktors VII im Einphasentest	22
3.1. 7.	Bestimmung der Aktivität des Faktors VIII im Einphasentest	22
3.1. 8.	Bestimmung der Aktivität des Faktors IX im Einphasentest	23

3.1. 9. Bestimmung der Aktivität des Faktors X im Einphasentest 24
3.1.10. Bestimmung der Fibrinogenkonzentration mit Hilfe der radialen Immundiffusion 24
3.1.11. Bestimmung der Antithrombin-III-Aktivität mit einem amidolytischen Verfahren 26

3.2. Klinisch-chemische Analysen 27
3.2. 1. Bestimmung der Proteinkonzentration (Biuret-Methode) 27
3.2. 2. Bestimmung der Chloridionenkonzentration 28
3.2. 3. Bestimmung der Konzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium mit einem Flammenphotometer 29
3.2. 4. Bestimmung der Osmolalität 29
3.2. 5. Bestimmung der Bikarbonatkonzentration, des Kohlendioxidpartialdruckes und des pH-Wertes 30
3.2. 6. Bestimmung der hydrolytischen Aktivität mit dem Substrat S 2160 (Proteasennachweis) 31

4. ERGEBNISSE 33

4.1. Ergebnisse der Gerinnungsanalysen 33
4.1. 2. Einphasen-Thromboplastingerinnungszeit nach Quick (Quick-Wert) 33
4.1. 2. Partielle Thromboplastinzeiten (PTT) 39
4.1. 3. Thrombinzeiten 42
4.1. 4. Faktor-II-Bestimmungen 43
4.1. 5. Faktor-V-Bestimmungen 44
4.1. 6. Faktor-VII-Bestimmungen 45
4.1. 7. Faktor-VIII-Bestimmungen 46
4.1. 8. Faktor-IX-Bestimmungen 47
4.1. 9. Faktor-X-Bestimmungen 48
4.1.10. Fibrinogenkonzentrationen 49
4.1.11. Antithrombin-III-Aktivitäten 51

4.2. Ergebnisse der klinisch-chemischen Untersuchungen 52
4.2. 1. Proteinkonzentrationen 52

4.2. 2. Chloridionenkonzentrationen 54
4.2. 3. Konzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium 56
4.2. 4. Osmolalitätsbestimmungen 60
4.2. 5. Bikarbonatkonzentrationen, Kohlendioxidpartialdrücke und pH-Werte 62
4.2. 6. Hydrolytische Aktivitäten mit S 2160 (Proteasennachweis) 65

5. DISKUSSION 67

5.1. Hämostaseologische Parameter 67
5.1. 1. Thromboplastingerinnungszeit nach Quick (Quick-Wert) 67
5.1. 2. Partielle Thromboplastinzeit (PTT) 71
5.1. 3. Thrombinzeiten 71
5.1. 4. Bestimmungen der Aktivitäten einzelner Faktoren 72
5.1. 5. Fibrinogenkonzentrationen 74
5.1. 6. Antithrombin-III-Aktivitäten 75

5.2. Klinisch-chemische Parameter 76
5.2. 1. Protein-, Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chloridkonzentrationen 76
5.2. 2. Osmolalitäten 79
5.2. 3. pH-Werte, Bikarbonatkonzentrationen, Kohlendioxidpartialdrücke und Pufferzusätze 82
5.2. 4. Hydrolytische Aktivitäten mit S 2160 83

5.3. Vorschläge für Qualitätskontrollplasmen für Blutgerinnungsanalysen 83

6. ZUSAMMENFASSUNG 87

7. LITERATURVERZEICHNIS 91

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Qualitätskontrolle in der Klinischen Chemie

Da Laboruntersuchungen in zunehmenden Maße für die Diagnostik und zur Therapieüberwachung eingesetzt werden, erhalten Meßdaten aus dem Labor ein hohes Gewicht bei der Behandlung von Patienten. Deshalb stellt sich die Frage nach der Zuverlässigkeit von Laboruntersuchungen. Diese wird mit Hilfe der Qualitätskontrolle untersucht, die es ermöglicht, rechtzeitig Maßnahmen zur Sicherstellung der Zuverlässigkeit von Laborergebnissen zu ergreifen.
Die Richtigkeit der Analysenresultate zu gewährleisten <16> und die Zuverlässigkeit von Laborergebnissen zu steigern <24>, gelten als Ziele der Qualitätskontrollmaßnahmen.

1.2. Prinzipien, Methoden und Begriffe der Qualitätskontrolle in der Klinischen Chemie

Falsche Ergebnisse von Analysen müssen nicht unbedingt ihre Ursache im Labor haben, sondern können auch durch Störungen und Fehler in anderen Bereichen (zum Beispiel bei der Probengewinnung) bedingt sein. Während Maßnahmen der Qualitätssicherung bei der Vorbereitung des Patienten und der Probenabnahme beginnen und alle Vorgänge bis zur Ergebnisübermittlung umfassen, überwacht die statistische Qualitätskontrolle lediglich den eigentlichen Analysenprozeß <24>.
Die Zuverlässigkeit einer bestimmten Analysenmethode ist nach R. Richterich <43> der Oberbegriff für die nachfolgenden Parameter:

1. der Spezifität; das heißt, der qualitativen oder quanitativen Erfassung einer einzigen Substanz

2. der Richtigkeit; das heißt, daß ein einzelner Meßwert von der tatsächlich im Untersuchungsmaterial vorliegenden Menge nur möglichst wenig abweicht

3. der Präzision; die die Zuverlässigkeit einer bestimmten Methode beschreibt, die durch verschiedene Untersucher, mit verschiedenen Laborgeräten und an verschiedenen Tagen durchgeführt wird

4. der Empfindlichkeit, die derjenigen Menge Analysensubstanz entspricht, die bei einer Bestimmung gerade noch nachweisbar ist

5. der praktischen Bewährung über eine längere Zeitdauer.

Übernimmt man eine bestimmte Analysenmethode, die be-

friedigende Ergebnisse dieser fünf Parameter aufweist, in die Routinediagnostik, so kann die laufende Kontrolle der Zuverlässigkeit auf die Überwachung von Präzision und Richtigkeit beschränkt werden <24>.

Die Präzision weist auf unvermeidbare zufällige Fehler hin, die jedem Analysenprozeß eigen sind. Sie führen zu einer Streuung der Analysenresultate in Form einer Gauß'schen Normalverteilung. Deshalb wird die Präzision durch die Standardabweichung s charakterisiert, die damit auch ein Maß für die zufälligen Fehler ist <24>. Um die Präzision verschiedener Methoden vergleichbar zu machen, wird jene als Variationskoeffizient ausgedrückt (nach der DIN-Norm 58.936 Teil 3 <19> relative prozentuale Standardabweichung genannt). Die Richtigkeit wird durch systematische Fehler beeinflußt, die dazu führen, daß die Analysenresultate in gleicher Richtung (nach oben oder unten) vom Sollwert abweichen <43>.

Zur Kontrolle der Präzision wird eine Kontrollprobe nicht notwendig bekannter Zusammensetzung eingesetzt <16>, deren Wert jedoch an der häufigsten Entscheidungsgrenze liegen sollte <24>.

Die Richtigkeit wird durch eine Kontrollprobe konstanter und genau bekannter Zusammensetzung überwacht <16>. Gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer <4> werden die Sollwerte dieser Richtigkeitskontrollproben durch Referenzlaboratorien ermittelt, die dazu gebräuchliche, möglichst spezifische Methoden mit besonders guter Präzision anwenden.

Kontrollmaterialien müssen in ihrer Beschaffenheit und Zusammensetzung dem Untersuchungsgut möglichst ähnlich sein <4, 24>. Sie sollten neben der zu analysierenden Substanz möglichst alle jene Komponenten enthalten, die auch in den zu untersuchenden Proben vorkommen <24>.

Das Prinzip der statistischen Qualitätskontrolle beruht darauf, daß Kontrollproben in der Routinediagnostik mitgeführt werden, von derer Ergebnissen man auf die

Zuverlässigkeit der Meßwerte von Patientenproben zurückschließt <24>.

Die Richtlinien der Bundesärztekammer <4> unterscheiden bei der Qualitätskontrolle zwischen der statistischen Qualitätskontrolle, die eine systematische Überwachung der Präzision unter Wiederholbedingungen und der Richtigkeit bei quantitativen Bestimmungen erlaubt, und den Ringversuchen, die eine objektive Überwachung der Richtigkeit unter Vergleichsbedingungen ermöglichen soll. Die statistische Qualitätskontrolle wird auch als interne Qualitätskontrolle bezeichnet, der die Ringversuche als externe Qualitätskontrolle gegenübergestellt werden <24>. Die Richtlinien der Bundesärztekammer verlangen, daß Präzisionskontrollproben in jeder Untersuchungsserie mindestens einmal analysiert werden.

Die Ergebnisse der Präzisionskontrollen sollen in Kontrollkarten eingetragen werden. In diesen wird jeder einzelnen Analysenserie (Abszisse) das Analysenresultat der Kontrollprobe (Ordinate) zugeordnet. Durch eine horizontale Linie ist der Mittelwert derselben Kontrollplasmacharge in einer zwanzigtägigien Vorperiode in der Kontrollkarte dargestellt. Vier weitere Linien kennzeichnen die Bereiche der doppelten (Warngrenzen) und dreifachen Standardabweichungen (Kontrollgrenze). Die Methode ist dann außer Kontrolle, wenn der Wert einer Präzisionskontrollprobe außerhalb der Kontrollgrenzen (3-s-Bereich) liegt oder sieben aufeinanderfolgende Werte eine aufsteigende beziehungsweise abfallende Tendenz aufweisen. Das gleiche gilt, wenn sieben aufeinanderfolgende Werte größer beziehungsweise kleiner als der Mittelwert sind.

Richtigkeitskontrollen sollen gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer <4> blind in jeder vierten Serie mitgeführt werden. Hierfür brauchen keine Kontrollkarten geführt zu werden.

Eine ausreichende Präzision liegt vor, wenn die relative Standardabweichung 5 % nicht überschreitet. Aus-

nahmen sind in den Ausführungsbestimmungen und Erläuterungen zu den Richtlinien aus dem Jahre 1974 <5> für bestimmte Parameter angegeben. So darf zum Beispiel bei der Bestimmungen von Gerinnungsfaktoren außer Calcium die relative Standardabweichung bis zu 10 % betragen. Für Untersuchungen der Richtigkeit dürfen die Abweichungen vom Sollwert 10 % nicht überschreiten. Für die oben erwähnten Ausnahmen bei der Präzisionskontrolle dürfen diese Abweichungen nicht größer als 20 % sein.

1.3. Probleme der Qualitätskontrolle in der Hämostaseologie

Laboratoriumsuntersuchungen spielen in der Diagnostik und Therapie von Blutgerinnungsstörungen eine bedeutende Rolle. Die genaue Abklärung der Art einer hereditären Gerinnungsstörung ist nur mit Hilfe von Anamnese und Laboruntersuchungen möglich. So läßt sich zum Beispiel eine Hämophilie A oder B oder ein anderer hereditärer Defekt des plasmatischen Gerinnungssystems nur mit speziellen Gerinnungsanalysen genau unterscheiden. Die Bedeutung hämostaseologischer Untersuchungen läßt sich daran erkennen, daß erst nach genauer Diagnostik eine gezielte Substitutionsbehandlung eines hereditären Gerinnungsdefektes möglich wird.
Daneben spielen Gerinnungsanalysen eine bedeutende Rolle bei der Überwachung und Therapieeinstellung von Medikationen, die zur Thromboseprophylaxe eingesetzt werden. Dies gilt für die Bestimmung der Thromboplastingerinnungszeit nach Quick bei der oralen Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten, für die Thrombinzeit <36> und partielle Thromboplastinzeit <51> bei der Heparintherapie sowie für die Thrombinzeit bei der fibrinolytischen Therapie mit Streptokinase und Urokinase <36>. An die Zuverlässigkeit dieser Gerinnungsanalysen werden hohe Anforderungen gestellt. So ist zum Beispiel

der therapeutische Bereich bei der Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten sehr eng: 15 bis 25 % mit Unterschieden je nach der zu Untersuchung benutzten Methodenmodifikation zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick. Medikationen, die Prozentaktivitäten im Quick-Test außerhalb dieses Bereiches ergeben, bewirken eine unzureichende Thromboseprophylaxe, wenn eine zu hohe Aktivität gemessen wird, oder es können Flutungen auftreten, wenn eine zu geringe Aktivität gemessen wird.

Bei der Anwendung des Konzeptes der statistischen Qualitätskontrolle auf hämostaseologische Untersuchungsverfahren sind die besonderen Eigenschaften und Gegebenheiten dieser Tests zu berücksichtigen. So ist zum Beispiel für die Testmethoden für das vaskuläre und thrombocytäre System nach H. Beeser <9> die statistische Qualitätskontrolle nicht anwendbar. Dies gilt insbesondere für die Thrombocytenfunktionstest, nicht jedoch für die Bestimmung der Thrombocytenzahl, sowie für die am Patienten ausgeführten Tests wie Blutungszeit, Saugglockentest und Rumpel-Leede-Test <9>. H. Beeser <9> hält die Qualitätssicherung gerinnungsphysiologischer Untersuchungen für realisierbar, obwohl Gerinnungsanalysen besonders störanfällig <9, 10, 21> sind. So reagieren diese Tests empfindlich auf pH-Verschiebungen, Temperaturschwankungen, Verunreinigungen der Reaktionsgefäße, Konzentrationsverluste der Reagenzien etc. <53>.

Die Störanfälligkeit beruht auch auf der Vielzahl möglicherweise interferierender Einflüsse, die per se in der Probe vorhanden sind, sowie auf der Labilität der biologischen Aktivität hämostaseologischer Parameter <9>.

Die meisten gerinnungsphysiologischen Testverfahren beruhen darauf, daß nach Aktivierung des exogenen oder endogenen Gerinnungssystems die enzymatischen Prozesse des plasmatischen Gerinnungssystems bis zur Bildung des

Fibrins ablaufen. Dabei wird die Zeit von der Rekalzifizierung bis zum Auftreten des Fibringerinnsels gemessen. Aufgrund der Komplexität des plasmatischen Gerinnungssystems, die aus zahlreichen Schaubildern der "Gerinnungskaskade" hervorgehen <zum Beispiel 9, 36, 44>, wird die Störanfälligkeit der Gerinnungsanalysen verständlich: an vielen Stellen können exogene oder endogene Einflüsse das Ergebnis verfälschen. Darüberhinaus steht nach H. Beeser <9> die Komplexität der heute verfügbaren Reaktionsgemische zur quantitativen Erfassung von Gerinnungsaktivitäten einer ausreichenden Qualitätssicherung im Wege.
Die Notwendigkeit einer statistischen Qualitätskontrolle mit Qualitätskontrollplasmen geht aus der Bedeutung von Gerinnungsanalysen für die Behandlung der Patienten und den vielfältigen Störmöglichkeiten der Tests hervor. Daneben haben die Kassenärztlichen Vereinigungen beschlossen, von allen Ärzten, die Laborleistungen erbringen, eine Qualitätssicherung ihrer Analysen gemäß den Richtlinien der Bundesäztekammer zu verlangen <6>, was auch Gerinnungsuntersuchungen einschließt.

1.4. Aufgabenstellung

Möglichst viele kommerzielle Qualitätskontrollplasmen für Gerinnungsanalysen, die in einem bestimmten Zeitraum in der Bundesrepublik Deutschland erhältlich waren sollten in den Tests untersucht werden, für die sie vom Hersteller zugelassen waren. Jeder Gerinnungsparameter sollte bei allen Plasmen mit nur einer Methode untersucht werden. Zum Vergleich sollte das Normalplasma des Instituts bei allen Untersuchungen mitgeführt werden. Um Veränderungen der Kontrollplasmen während des Produktions- und Lyophilisationsprozesses nachzuweisen, sollten einige wichtige klinisch-chemische Parameter der Plasmen bestimmt werden.

2. Materialien

2.1. Untersuchte Kontrollplasmen

Die untersuchten Qualitätskontrollplasmen werden in alphabetischer Reihenfolge des Namens der Herstellerfirma aufgelistet. Die Zahlen der fortlaufenden Numerierung, unter denen die Plasmen hier aufgeführt werden, dienen auch als Kennzahlen für die Kontrollplasmen in später dargestellten Tabellen und Diagrammen. Für jedes untersuchte Kontrollplasma werden in dieser Zusammenstellung genaue Bezeichnung, Hersteller und Chargennummer angegeben, während die von den Herstellern in den Beipackzetteln mitgeteilten Zielwerte und Anwendungsgebiete im Abschnitt Ergebnisse aufgeführt werden.

01 Kontroll-Plasma N (human) mit Analysenwerten für die Richtigkeitskontrolle von Gerinnungstesten/Normalbereich (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)
Charge: ORKE 12/13 502767 B

02 Kontroll-Plasma U (human) für die Präzisionskontrolle von von Gerinnungstests ohne Analysenwerte (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)
Charge: OTXR 08/09 A 503803 A

03 Pathoplasma^{R} I: Pathologisches Human-Citratplasma I (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)
Charge: OTXK 10/11 502819 C

04 Pathoplasma^{R} II: Pathologisches Human-Citratplasma II (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)
Charge: OTXL 10/11 502918 C

05 Normal Control Plasma (citrated) (bio Mérieux, Charbonnières-les-Bains, Frankreich)
Charge: 01006

06 Normal Control Plasma (oxalated) (bio Mérieux, Charbonnières-les-Bains, Frankreich)
Charge: 06003

07 Citrated Control Plasma "C" (bio Mérieux, Charbonnières-les-Bains, Frankreich)
Charge: 01008

08 Abnormal Control Plasma (bio Mérieux, Charbonniéres-les-Bains, Frankreich)
Charge: 02004

09 Plasma référence Faktor VIII + IX (bio Mérieux, Charbonnières-les-Bains, Frankreich)
Charge: 01909

10 Verify Normal Citrat, lyophilisiertes Human-Kontrollplasma mit normaler Gerinnungsaktivität (General Diagnostics, Vertrieb Labordiagnostica Gödecke, Freiburg)
Charge: 4 H 868

11 Verify Abnormal I Citrat, lyophilisiertes Human-Kontrollplasma mit verminderter Gerinnungsaktivität (General Diagnostics, Vertrieb Labordiagnostica Gödecke, Freiburg)
Charge: 2160100

12 Verify Abnormal II Citrat, lyophilisiertes Human-Kontrollplasma mit stark verminderter Gerinnungsaktivität (General Diagnostics, Vertrieb Labordiagnostica Gödecke, Freiburg)
Charge: 4 H 684

13 Kontroll-Citratplasma normal (Roche) (Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel/Schweiz)
Charge: T 1338 8533

14 Kontroll-Citratplasma pathologisch (Roche) (Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel/Schweiz)
Charge: T 2133 8473

15 Kontrollplasma AK-R zur Richtigkeitskontrolle von Thromboplastinzeitbestimmungen im therapeutischen Bereich der oralen Antikoagulation (Immuno Diagnostika GmbH, Wien)
Charge: AK 043

16 Kontrollplasma AK-P zur Präzisionskontrolle von Gerinnungsanalysen im therapeutischen Bereich der oralen Antikoagulation (Immuno Diagnostika GmbH, Wien)
Charge: AK 045

17 Kontrollplasma Normal TPZ, zur Präzisions- und Richtigkeitskontrolle der Thromboplastinzeitbestimmung ("Quick") im Normalbereich (Immuno Diagnostica GmbH, Wien)
Charge: R 34

18 PTT-Kontrollplasma normal (Immuno Diagnostica GmbH, Wien)
Charge: KN 09

19 PTT-Kontrollplasma abnormal (Immuno Diagnostica GmbH, Wien)
Charge: KP 13

20 Kontrollplasma 20,5 % Faktor VIII (Immuno Diagnostica GmbH, Wien)
Charge: KF 824

21 Kontrollplasma 20 % Faktor IX (Immuno Diagnostica GmbH, Wien)
Charge: KF 910

22 Referenzplasma 100 % Faktor V, VII, X (Immuno Diagnostica GmbH, Wien)
Charge: RS 38
für die Bestimmung des Faktors V aufzulösen in 0,80 ml Aqua destillata, für die Bestimmung der Faktoren VII und X in 0,85 ml Aqua destillata.

23 Ci-trol-1, Kontrollplasma im Normalbereich (Merz + Dade, Abteilung der AHS Deutschland GmbH, München)
Charge: COL-1-148

24 Ci-trol-2, Kontrollplasma im abnormalen Bereich (Therapiekontrolle) (Merz + Dade, Abteilung der AHS Deutschland GmbH, München)
Charge: COL-3-339

25 Ci-trol-3, Kontrollplasma im abnormalen Bereich (pathologisch tief) (Merz + Dade, Abteilung der AHS Deutschland GmbH, München)
Charge: APS-520

26 Plasma Control (Plus) (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: 26

27 Quick-Control normal, Kontrollplasma für den Quick-Test (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: N 88 und N 89

28 Quick-Control abnormal I, Kontrollplasma für den Quick-Test (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: P 88 und P 89

29 Quick-Control abnormal II, Kontrollplasma für den Quick-Test (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: P 88 und P 89

30 PTT-Control normal, Kontrollplasma für die partielle Thromboboplastinzeit (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: N 50

31 PTT-Control abnormal, Kontrollplasma für die partielle Thromboplastinzeit (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: P 50

32 Thrombin/Fibrinogen-Control normal, Kontrollplasma für die Thrombinzeit- und Fibrinogen-Bestimmung (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: N 45

33 Thrombin/Fibrinogen-Control abnormal, Kontrollplasma für die Thrombinzeit- und Fibrinogen-Bestimmung (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: P 45

34 Plasma Control VIII/IX normal, Kontrollplasma für die Bestimmung der Faktoren VIII und IX (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: N 22

35 Plasma Control VIII/IX abnormal, Kontrollplasma für die Bestimmung der Faktoren VIII und IX (STAGO, Boehringer Mannheim GmbH)
Charge: P 20

Die Lyophilisate der Kontrollplasmen wurden in den von den Herstellern angegebenen Medien (destilliertes oder bidestilliertes Wasser) genau nach Anweisung rekonstituiert.

2.2. Benutzte Geräte und Materialien:

2.2. 1. Koagulometer nach Schnittger-Gross mit einer als Automatikpipette geschalteten 100 µl Kolbenpipette der Firma Eppendorf

2.2. 2. Thermostat für 37° C zur Vorwärmung der im Koagulometer benutzten Kunststoffröhrchen

2.2. 3. Normalplasma des Instituts
Mischplasma aus dem in Bezug auf bestimmte Gerinnungsparameter kontrollierten Blut von mindestens vier Spendern mit Zusatz von 0,1 molarem Natriumcitrat-Zitronensäure-Puffer im Verhältnis 1 : 10 sowie 1 ml Trasylol pro 100 ml und einem pH = 7,15, eingestellt mit kristalliner Hepes-Puffersubstanz.
Auftauen des bei - 80° C in Kunststoffröhrchen tiefgefroren gelagerten Normalplasmapools durch Inkubation im Wasserbad bei 37° C mit geöffnetem Röhrchen für 15 Minuten

2.2. 4. Second International Standard Blood Coagulation Factor VIII Human 73/552 (established 1976); das Lyophilisat einer Ampulle entspricht 1,1 Internationalen Einheiten Faktor VIII

2.2. 5. Blood Coagulation Factor IX, Human 72/32 (first International Standard, established 1976); das Lyophilisat einer Ampulle entspricht 5,6 Internationalen Einheiten Faktor IX

2.2. 6. Diäthylbarbiturat-Acetat-Pufferlösung pH = 7,6 für Gerinnungstests (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

2.2. 7. Thromboplastin des Instituts
vom Institut selbst hergestelltes Thromboplastin aus humaner grauer Hirnsubstanz, die mit Aceton entwässert wurde und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen wurde.
Auftauen des ebenfalls bei - 80° C in Kunststoffröhrchen tiefgefroren gelagerten Thromboplastins durch Inkubation im Wasserbad bei 37° C mit geöffnetem Röhrchen für 15 Minuten

2.2. 8. Pathromtin^{R}, Reagenz zur Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

2.2. 9. Test-Thrombin 30 IU/ml vom Rind (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

2.2.10. Mangelplasmen für die Faktoren V, VII, VIII, IX und X (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

2.2.11. Calciumchlorid-Lösung, 0,025 mol/l (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

2.2.12. Eppendorf Photometer 1101 M mit dem Filter Hg 405 nm, angeschlossen an den Rechner LDC 277

2.2.13. Set zur Bestimmung der Antithrombin-III-Aktivität (Gerinnungs-Diagnostica Boehringer Mannheim)

2.2.14. M-Partigen^{R}-Immundiffusionsplatten für quantitative Plasmaprotein-Bestimmungen mit Hilfe der radialen Immundiffusion (Mancini-Technik): Fibrinogen (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

2.2.15. Protein-Standard-Plasma (human) für quantitative immunologische Plasmaprotein-Bestimmungen (Aufstellung von Bezugskurven): Fibrinogen 276 mg/dl (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

2.2.16. Kontrollplasma (human) für Partigen^{R} zur Richtigkeitskontrolle quantitativer Plasmaprotein-Bestimmungen: Fibrinogen 143 mg/dl (Vertrauensbereich von 121,5 mg/dl bis 164,5 mg/dl)
(Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

2.2.17. Mikro-Pipette 10 µl (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz)

2.2.18. TG Calibration Reviewer zur Auswertung der Partigen^{R}-Platten

2.2.19. Zentrifugalanalysator Roche Cobas bio (Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel/Schweiz)

2.2.20. Biuret-Reagenz T 3131 (Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel/Schweiz)

2.2.21. Control Serum N Roche, lyophilisiertes Kontrollserum vom Pferd: Eiweißgehalt 6,35 g/dl (Hoffmann-La Roche & Co., AG; Basel/Schweiz)

2.2.22. Control Serum P Roche, lyophilisiertes Kontrollserum vom Pferd: Eiweißgehalt 6,6 g/dl (Hoffmann-La Roche & Co., AG, Basel/Schweiz)

2.2.23. Lab-Trol^{R} E normal, Eiweißgehalt 7,2 g/dl (Vertrauensbereich von 6,9 g/dl bis 7,5 g/dl) (Merz + Dade, Abteilung der AHS Deutschland GmbH, München)

2.2.24. Corning Chloridmeter 920 (Corning Medical, Halstead, Essex, England)

2.2.25 Chloridmeter-Eichlösung 100 mmol Chlorid/l (Corning Medical, Halsted, Essex, England)

2.2.26. Säurepufferlösung für Chloridmeter, dargestellt durch Gabe von 23 ml Eisessig und 3,5 ml 30 % Salpetersäure zu Aqua bidestillata in einen 500 ml Meßkolben und anschließendes Auffüllen bis zur Eichmarke (Salpetersäure und Eisessig von p. a. Qualität)

2.2.27. 4-Kanal-Flammenphotometer FCM 6341 mit Mikroprozessor zur Bestimmung von Na^+, K^+, Ca^{++} und Li^+ (Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz GmbH, Hamburg)

2.2.28. Serum-Standard-Stammlösung für flammenphotometrische Analysen mit angegebenen Konzentrationen für Na^+, K^+ und Ca^{++} (Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz GmbH, Hamburg)

2.2.29. Lithium-Stammlösung für flammenphotometrische Serumanalysen (Fppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz GmbH, Hamburg)

2.2.30. Dual Diluter zur Verdünnung der Proben für die Flammenphotometrie, Verdünnungsverhältnis 1 : 51 (Firma Kalger, Neuberg)

2.2.31. Roebling Osmometer (Medizinische Technik und Elektronik Vogel, Gießen)

2.2.32. Osmometer-Eichlösung 400 mosmol/kg H_2O entsprechend 12,687 g NaCl/kg H_2O (Firma Knauer)

2.2.33. Blutgasanalysator Radiometer Copenhagen ABL 2 Acid Base Laboratory

2.2.34. Kapillaren zur Eingabe der Proben, Typ D 551/12,5/200 mit ungefähr 0,55 mg Natriumheparinat pro ml (Radiometer Copenhagen)

2.2.35. S 2160, 25 mg pro Fläschchen (Kabi Diagnostica, Stockholm, Schweden)

2.2.36. 0,05 mol/l Tris-Pufferlösung pH = 8,6, dargestellt durch Einwaage von 0,605 g Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan in einen Meßkolben für 100 ml mit Aqua bidestillata und Einstellung des pH mit 0,1 n Salzsäurelösung, bevor bis zur Eichmarke aufgefüllt wird

3. Methoden

3.1. Gerinnungsanalysen

Die Gerinnungsparameter der Qualitätskontrollplasmen und des mitgeführten Normalplasmas des Instituts wurden mit den Methoden bestimmt, die auch im Institut bei Untersuchungen in der Routinediagnostik angewandt werden. Falls Eichkurven bei einer bestimmten Gerinnungsanalyse erforderlich waren, wurden diese auf das Normalplasma des Instituts bezogen, wenn nicht internationale Standards (Faktor-VIII- und -IX-Bestimmung) eingesetzt werden konnten.

3.1. 1. Bestimmung der Einphasen-Thromboplastingerinnungszeit nach Quick (Quick-Wert)

Prinzip:

Die zu untersuchende Probe wird mit Diäthylbarbiturat-Acetat-Pufferlösung und humanem Hirnthromboplastin versetzt und für eine bestimmte Zeit bei 37° C inkubiert. Durch Zugabe eines Überschusses von Cal-

ciumionen wird der Ansatz zur Gerinnung gebracht und die Gerinnungszeit in einem Koagulometer nach Schnittger-Gross bei 37° C gemessen.
Die Einphasen-Thromboplastingerinnungszeit nach Quick erfaßt alle am exogenen Gerinnungssystem beteiligten Faktoren (VII, X, V, II und Fibrinogen), wobei allerdings die Empfindlichkeit gegenüber verminderten Fibrinogenkonzentrationen gering ist.
Die ermittelten Gerinnungszeiten werden im doppeltlogarithmischen System den Konzentrationen des institutseigenen Normalplasmas ("Normprozente") zugeordnet.

Durchführung:

In ein vorgewärmtes Kunststoffröhrchen werden pipettiert

100 µl Probe
100 µl Diäthylbarbiturat-Acetat-Pufferlösung mit einem pH = 7,6
100 µl humanes Hirnthromboplastin, vorgewärmt auf 37° C.

Der Ansatz wird vorsichtig gemischt, 20 bis 30 Sekunden bei 37° C inkubiert und durch Zugabe von

100 µl einer bei 37° C vorgewärmten 0,025 molaren $CaCl_2$- Lösung

rekalzifiziert. Die Gerinnungszeit wird im Koagulometer bestimmt.

3.1. 2. Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT)

Prinzip:

Die zu untersuchende Probe und partielles Thromboplastinreagenz, das aus Phospholipiden und einer Kaolin-Suspension als Oberflächenaktivator besteht, werden zu gleichen Teilen gemischt und für eine festgelegte Zeit bei 37° C inkubiert. Nach Rekalzifizierung mit einem Überschuß an Calciumionen wird der Gerinnungsendpunkt in einem Koagulometer bestimmt.
Die Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit erfaßt die Aktivitäten der am endogenen Gerinnungssystem beteiligten Faktoren (XII, XI, X, IX, VIII, V, II und Fibrinogen) mit unterschiedlicher Empfindlichkeit.

Durchführung:

In ein vorgewärmtes Kunststoffröhrchen werden pipettiert

100 µl Probe
100 µl gut aufgeschütteltes partielles Thromboplastinreagenz (Pathromtin^{R}).

Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und exakt zwei Minuten bei 37° C inkubiert. Genau dann wird rekalzifiziert durch Zugabe von

100 µl einer 0,025 molaren $CaCl_2$-Lösung, vorgewärmt bei 37° C.

Der Gerinnungsendpunkt wird anschließend in üblicher Weise mit dem Koagulometer nach Schnittger-Gross bestimmt.

3.1. 3. Bestimmung der Plasma-Thrombin-Gerinnungszeit (Thrombinzeit)

Prinzip:

Man versetzt die zu untersuchende Probe mit einer Thrombinlösung bekannter Aktivität und mißt die Zeit bis zur Entstehung des Fibringerinnsels. Die Thrombinzeit weist insbesondere eine Abhängigkeit von der in der Probe vorhandenen Konzentration an Fibrinogen, Antithrombin III, Heparin und Fibrinspaltprodukten auf.

Durchführung:

In ein vorgewärmtes Kunststoffröhrchen werden pipettiert

100 µl Diäthylbarbiturat-Acetat-Pufferlösung mit einem pH = 7,6

100 µl Probe.

Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und verbleibt für mindestens 30 Sekunden bei 37° C, bevor zugegeben wird

100 µl Test-Thrombin-Gebrauchslösung (3 IU/ml).

Die Gerinnungszeit wird im Koagulometer nach Schnittger-Gross bestimmt.

3.1. 4. Bestimmung der Aktivität des Faktors II im Einphasentest

Prinzip:

Die Bestimmung des Faktors II beruht auf einer Modifikation der Einphasen-Thromboplastingerinnungszeit nach Quick. Dabei wird die zu untersuchende Probe sowohl mit dem humanen Hirnthromboplastin als auch

einem Mangelplasma für Faktor II versetzt, das diesen nur in einer sehr geringen Aktivität (≤ 0,1 % Restaktivität) enthält. Nach einer festgelegten Inkubationszeit bei 37° C, während der das exogene Gerinnungssystem aktiviert wird, wird der Ansatz durch Zugabe eines Überschusses an Calciumionen rekalzifiziert. Die dabei ermittelte Gerinnungszeit steht in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis zur limitierend wirkenden Aktivität des Faktors II in der Probe.

Für verschiedene Verdünnungen des institutseigenen Normalplasmas ermittelt man die Gerinnungszeiten in der beschriebenen Faktor-II-Bestimmung und trägt sie gegen die Verdünnung auf doppeltlogarithmischen Papier auf. Diese Bezugskurve dient zur Umwandlung der Gerinnungszeiten der Proben in Prozentaktivitäten des Normalplasmas.

Durchführung:

In ein vorgewärmtes Kunststoffröhrchen werden pipettiert

100 µl Probe (verdünnt mit Diäthylbarbiturat-Acetat-Pufferlösung pH = 7,6 im Verhältnis 1 : 20; bei Aktivitäten über 100 % 1 : 40 verdünnt)

100 µl Faktor-II-Mangelplasma

100 µl humanes Hirnthromboplastin, auf 37° C vorgewärmt.

Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und bei 37° C inkubiert. Nach genau 30 Sekunden rekalzifiziert man durch Zugabe von

100 µl einer 0,025 molaren $CaCl_2$-Lösung, vorgewärmt bei 37° C.

Die Gerinnungszeit wird mit einem Koagulometer bestimmt.

3.1. 5. Bestimmung der Aktivität des Faktors V im Einphasentest

Prinzip und Durchführung sind wie bei der Bestimmung des Faktors II; es wird nur anstelle des Faktor-II-Mangelplasmas das Faktor-V-Mangelplasma (Restaktivität für Faktor V $\leq$ 1 %) gebraucht und eine eigene Bezugskurve aufgestellt.

3.1. 6. Bestimmung der Aktivität des Faktors VII im Einphasentest

Es wird das Faktor-VII-Mangelplasma (Restaktivität für Faktor VII $\leq$ 1 %) eingesetzt, im übrigen sind Prinzip und Durchführung des Tests wie bei der Faktor-II-Bestimmung. Es muß eine eigene Bezugskurve mit dem Normalplasma aufgestellt werden.

3.1. 7. Bestimmung der Aktivität des Faktors VIII im Einphasentest

Prinzip:

Die Bestimmung der Aktivität des Faktors VIII leitet sich von der Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit ab. Dabei wird die zu untersuchende Probe mit einem Mangelplasma für Faktor VIII (Restaktivität für diesen Faktor $\leq$ 0,01 IU/ml) und einem partiellen Thromboplastinreagenz (bestehend aus Phospholipiden und einem Oberflächenaktivator) zusammengegeben. Während der anschließenden Inkubation bei 37° C wird das endogene Gerinnungssystem aktiviert. Durch Rekalzifizierung mit einem Überschuß an Calciumionen wird die Gerinnung in Gang gesetzt, wobei die Gerinnungszeit von der limitierend wir-

kenden Aktivität des Faktors VIII in der Probe bestimmt wird.
Zur Erstellung einer Bezugskurve werden für verschiedene Verdünnungen des Internationalen Standards für Faktor VIII die Gerinnungszeiten gemessen, die auf doppeltlogarithmischen Papier gegen die Verdünnungen aufgetragen werden. Mit Hilfe dieser Bezugskurve werden die Gerinnungszeiten der einzelnen Proben als Prozentaktivitäten des Internationalen Standards ausgedrückt.

Durchführung:

In ein vorgewärmtes Kunststoffröhrchen werden pipettiert

100 µl Probe (1 : 5 verdünnt mit Diäthylbarbiturat-Acetat-Pufferlösung pH = 7,6; bei Aktivitäten über 1,00 IU/ml im Verhältnis 1 : 10 verdünnt)
100 µl Mangelplasma für Faktor VIII
100 µl gut aufgeschütteltes partielles Thromboplastinreagenz (PathromtinR).

Der Ansatz wird bei 37° C inkubiert und sofort und alle zwei Minuten vorsichtig aufgeschüttelt. Nach exakt sechs Minuten wird durch Zugabe von

100 µl einer 0,025 molaren, bei 37° C vorgewärmten $CaCl_2$-Lösung rekalzifiziert.

Die Gerinnungszeit wird im Koagulometer nach Schnittger-Gross bestimmt.

3.1. 8. Bestimmung der Aktivität des Faktors IX im Einphasentest

Die Bestimmung des Faktors IX gleicht in Prinzip und Durchführung der des Faktors VIII; es wird jedoch das Faktor-IX-Mangelplasma (Restaktivität für Faktor IX

≤ 0,01 IU/ml) verwendet und für die Herstellung der Bezugskurve werden Verdünnungen des Internationalen Standards für Faktor IX benutzt.

3.1. 9. Bestimmung der Aktivität des Faktors X im Einphasentest

Prinzip und Durchführung sind wie bei der Faktor-II-Bestimmung, außer das hier das Faktor-X-Mangelplasma (Restaktivität für Faktor X ≤ 1 %) eingesetzt wird und eine eigene Bezugskurve mit dem Normalplasma aufgestellt wird.

3.1.10. Bestimmung der Fibrinogenkonzentration mit Hilfe der radialen Immundiffusion

Prinzip:

Definierte Probevolumina werden in die Auftragstellen kommerziell erhältlicher Agargelplatten gegeben, die homogen verteilte fibrinogenspezifische Antikörper enthalten. Durch Diffusion des Fibrinogens der Proben in das Agargel kommt es zur Ausbildung von Präzipitatringen. Dabei ist das Quadrat des Radius eines Ringes der Fibrinogenkonzentration in der Probe proportional. Durch Mitführung von Verdünnungen einer Lösung mit bekannter Fibrinogenkonzentration kann das Verfahren geeicht werden. Dadurch wird eine Umrechnung der Quadrate der Radien, die bei den Proben gemessen wurden, in Fibrinogenkonzentrationen mit Hilfe einer Eichkurve ermöglicht.

Durchführung:

In die zwölf Auftragsstellen der M-Partiger^{R}-Immundiffusionsplatten für Fibrinogen werden jeweils 5 µl der unten angegebenen Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung mit Hilfe einer Mikropipette aufgetragen:

1	Protein-Standard-Plasma unverdünnt
2	1 : 2 Verdünnung des Protein-Standard-Plasmas
3	1 : 4 Verdünnung des Protein-Standard-Plasmas
4 - 11	1 : 2 Verdünnungen der Proben
12	1 : 2 Verdünnung des Kontrollplasmas für Partigen^{R}-Platten.

Nach dreitägiger Inkubation auf einer streng horizontal eingestellten Platte bei Zimmertemperatur werden die Immunpräzipitatringe aller Auftragsstellen mit einem Ablesegerät ausgemessen und deren Quadrate gebildet. In einer Eichkurve trägt man die Quadrate der Radien des Protein-Standard-Plasmas und seiner Verdünnungen gegen deren bekannte Fibrinogenkonzentration auf und ermittelt damit den Fibrinogengehalt der Proben und des Kontrollplasmas für Partigen^{R}-Platten. Die Werte für diese mitgeführte Kontrolle waren immmer im vorgeschriebenen Kontrollbereich.

3.1.11. Bestimmung der Antithrombin-III-Aktivität mit einem amidolytischen Verfahren

Prinzip:

Der zu untersuchenden Probe wird Heparin und Thrombin in Überschuß zugegeben. Darüberhinaus wird dem Reaktionsansatz noch das spezifische Substrat (Tos-Gly-Pro-Arg-pNa) sowie ein Puffersystem und Aprotinin zugesetzt. Bei einer Reaktionstemperatur von 25° C bestimmt man dann die Änderung der Extinktion pro Zeit bei 405 nm Hg.
Das in der Probe vorhandene Antithrombin III bildet mit dem zugesetzten Heparin einen Komplex, der einen Teil des im Ansatz im Überschuß vorhandenen Thrombins irreversibel bindet. Dabei geht die Fähigkeit des Thrombins zur enzymatischen Katalyse verloren. Da Heparin und Thrombin im Ansatz im Überschuß vorhanden sind, bleibt noch freies Thrombin über, und zwar in Abhängigkeit von der Aktivität des in der Probe vorhandenen Antithrombins III. Das freie Thrombin spaltet dauernd aus dem spezifischen Substrat p-Nitroanilin ab, das zu einen kontinuierlichen Anstieg der Extinktion bei 405 nm Hg führt. Zieht man von der Extinktionsdifferenz pro Zeit des Leerwertes, der man durch Eingabe einer gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung anstelle der Probe erhält, die Extinktionsdifferenz der zu untersuchenden Probe ab, so erhält man einen Parameter, der proportional der Antithrombin-III-Aktivität in der Probe ist.

Durchführung:

In Kunststoffküvetten werden 100 µl einer 1 : 51 Kochsalzverdünnung der zu untersuchenden Probe sowie für den Leerwert 100 µl physiologische Kochsalzlösung pipettiert und mit 2 ml einer Reagenzienlösung (ent-

hält: 95 mmol/l Tris-HCl-Puffer pH = 8,1, 1,67 USP-Einheiten Heparin pro ml, 6,5 IU/ml Aprotinin, 0,024 U/ml Thrombin, 143 mmol/l NaCl; aus dem Antithrombin-III-Set von Boehringer, Mannheim) versetzt. Gestartet wird die Reaktion, die bei einer Temperatur von 25° C abläuft, durch Zugabe von 200 ul einer 1,9 millimolaren Lösung des spezifischen Substrats. Die Messung der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit und die Ausrechnung der Aktivitäten erfolgt automatisch durch einen an das Photometer (Eppendorf) angeschlossenen Rechner (LDC 277).

3.2. Klinisch-chemische Analysen

3.2. 1. Bestimmung der Proteinkonzentration (Biuret-Methode)

Prinzip:

Kupferionen bilden im alkalischen Milieu violett gefärbte Komplexe mit Proteinen. Dieses beruht auf der Bindung von einem Kupferion an zwei Carbamidbindungen des Proteins. Die Extinktion dieser Komplexe ist bei einer Wellenlänge von 550 nm der Zahl der Peptidbindungen und damit der Konzentration der Proteine proportional.

Durchführung:

Die Gesamteiweißbestimmung wurde mit dem Zentrifugalanalysator Roche Cobas bio (Firma Roche) durchgeführt. Die Methode wurde mit den Kontrollseren N und P der Firma Roche im Hinblick auf die Präzision geprüft. Als Reagenz wurde das Biuret-Reagenz T 3131 (Firma Roche) eingesetzt (Darstellung der Gebrauchs-

lösung: 2 ml Reagenz zu 10 ml Aqua destillata). Die Extinktion wurde bei 550 nm gemessen. Als Kontrolle wurde Lab-Trol^{R} F (Merz + Dade) mitgeführt.

3.2. 2. Bestimmung der Chloridionenkonzentration

Prinzip:

Ein festgelegtes Volumen der Probe wird in eine definierte Säurepufferlösung gegeben, in die vier Silberdrahtelektroden hineinreichen, und zwar je zwei des Generator- und Indikatorstromkreises. Der durch den Generatorstromkreis fließende Strom setzt kontinuierlich aus der Anode Silberkationen frei, die sofort durch die im Ansatz vorhandenen, aus der Probe stammenden Chloridionen ausgefällt werden. Sind die Chloridionen auf diese Weise aufgebraucht, bleiben die weiterhin entstehenden Silberkationen frei in Lösung und verursachen damit eine Änderung der Leitfähigkeit des Systems. Diese Leitfähigkeitsänderung wird durch den Indikatorstromkreis erfaßt, der dann den Generatorstromkreis abschaltet. Das Produkt aus Generatorstromstärke und Meßzeit ist dabei proportional der Chloridionenkonzentration in der Probe, die sich somit errechnen läßt (coulometrische Meßmethode).

Durchführung:

In den Meßbecher des Corning Chloridmeters gibt man 15 ml Säurepufferlösung und taucht die Silberdrahtelektroden ein. Mit Hilfe einer 100 µl Kolbenpipette werden 100 µl Aqua bidestillata zur Nullpunkteichung eingegeben. Darüberhinaus wird mit einer Lösung, die 100 mmol Cl^-/l enthält, geeicht. Zur Bestimmung der Proben werden 100 µl gebraucht. Durch eine Leuchtanzeige wird das Meßergebnis in mmol Cl^-/l angezeigt.

3.2. 3. Bestimmung der Konzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium mit einem Flammenphotometer

Prinzip:

Die verdünnte Probe wird zerstäubt und als Nebel in eine nicht leuchtende Acetylengasflamme geleitet, in der die Metalle verdampfen, angeregt werden und charakteristische Spektrallinien emittieren. Durch spektrale Zerlegung werden die Linien der einzelnen Metalle isoliert und auf Photometer geleitet. Der dort entstehende Strom ist der Lichtintensität der untersuchten Spektrallinie und damit der Konzentration des Metalles in der Probe proportional. Das Verfahren wird mit Lösungen bekannter Zusammensetzung geeicht.

Durchführung:

Das benutzte Flammmenphotometer wurde am Nullpunkt sowie mit einer bestimmten Serum-Standard-Lösung geeicht. Die Proben wurden mit einer lithiumhaltigen Verdünnungslösung durch einen Diluter im Verhältnis 1 : 51 verdünnt und in das Gerät eingebracht, das die Meßwerte digital anzeigte.

3.2. 4. Bestimmung der Osmolalität

Prinzip:

Die Gefrierpunktserniedrigung einer wässrigen Lösung ist proportional ihrer osmotischen Konzentration (kryoskopische Meßmethode).
Mit Hilfe des Peltier-Effektes wird die zu untersuchende Probe unterkühlt. Durch Eintauchen eines gekühlten Metalldrahtes wird die Kristallisierung aus-

gelöst. Die Eisbildung bewirkt durch Wärmefreisetzung einen Anstieg der Temperatur auf ein Plateau, das der Gefrierpunktserniedrigung entspricht. Durch eine Thermoelektrode wird die Temperatur gemessen und dann direkt als osmotische Konzentration angezeigt.

Durchführung:

Das Osmometer wird mit Hilfe von Aqua bidestillata am Nullpunkt und dazu mit einer Osmometer-Eichlösung bei 400 mosmol/kg H_2O (Firma Knauer) geeicht. Die Osmolalität wird in 100 µl der Probe gemessen und vom Gerät in mosmol/kg H_2O in der Anzeige ausgewiesen.

3.2. 5. Bestimmung der Bikarbonatkonzentration, des Kohlendioxidpartialdruckes und des pH-Wertes

Prinzip:

Der pH-Wert wird mit Hilfe einer pH-Elektrode direkt gemessen, während die Bikarbonatkonzentration aus dem Partialdruck für Kohlendioxid, der mit einer speziellen Elektrode gemessen wird, und dem pH-Wert über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet wird.

Durchführung:

Die geöffneten Probenfläschchen werden im Wasserbad bei 37° C für zehn Minuten inkubiert und anschliessend sofort verschlossen. Sie werden dann gut gemischt, in Kapillaren eingefüllt und in den Gasanalysator ABL 2 (Radiometer Kopenhagen) eingegeben, der die Meßwerte ausdruckt.

3.2. 6. Bestimmung der hydrolytischen Aktivität mit dem Substrat S 2160 (Proteasennachweis)

Prinzip:

Das Substrat S 2160 (N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-pNa) ist relativ unspezifisch. Es wird von verschiedenen Proteasen gespalten wird, wie zum Beispiel Thrombin, Trypsin und anderen. Die Proben werden mit S 2160 inkubiert, wobei die Zunahme der Extinktion bei 405 nm gemessen wird, die durch abgespaltenes p-Nitroanilin verursacht wird. Diese Extinktionszunahme pro Zeit ist proportional der hydrolytischen Aktivität der Probe.

Durchführung:

Zu 25 mg S 2160 werden 2,5 ml 0,05 molarer Tris-Pufferlösung pH = 8,6 und 2,5 ml Aqua bidestillata gegeben. Diese Suspension wird für etwa eine halbe Stunde mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Ultrasonic) beschallt, bis das Substrat vollständig in Lösung gegangen ist. Im Zentrifugalanalysator Roche Cobas bio wird mit einem speziellen Programm die Zunahme der Extinktion pro Minute bei 405 nm und einer Meßtemperatur von 37o C gemessen. Zur Messung der hydrolytischen Aktivität werden 10 µl Probe 1 : 5 verdünnt und mit 150 µl Reagenzlösung versetzt, so daß das Ansatzvolumen 200 µl beträgt.
Zur Berechnung der hydrolytischen Aktivität der Probe aus der Änderung der Extinktion pro Zeit gilt folgende Formel:

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{V \times f}{\varepsilon_{\mu mol} \times d \times v} \times \frac{\Delta E}{\Delta t}$$

Dabei bedeutet:

$\frac{\Delta c}{\Delta t}$: Konzentrationsänderung von p-Nitroanilin pro Zeit in µmol/min (hydrolytische Aktivität)

V : Ansatzvolumen in µl (200 µl)

d : Schichtdicke in cm (1 cm)

$\varepsilon_{\mu mol}$: spezifischer mikromolarer Extinktionskoeffizient für p-Nitroanilin bei 405 nm in $cm^2/\mu mol$ (10,5 $cm^2/\mu mol$)

v : Volumen der Probe in µl (10 µl)

f : Verdünnungsfaktor (5)

$\frac{\Delta E}{\Delta t}$: Extinktionsänderung pro Zeit in min^{-1}

Durch Einsetzen der Werte erhält man dann:

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{200 \times 5}{10,5 \times 1 \times 10} \times \frac{\Delta E}{\Delta t}$$

hydrolytische Aktivität:

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = 9,5 \times \frac{\Delta E}{\Delta t}$$

Mit Hilfe der oben angegebenen Beziehung kann aus der gemessenen Extinktionsänderung pro Zeit bei 405 nm durch Multiplikation mit dem Faktor 9,5 die Konzentrationsänderung von p-Nitroanilin pro Zeit berechnet werden. Dieser Parameter entspricht der hydrolytischen Aktivität der untersuchten Probe.

4. Ergebnisse

In den nachfolgenden Tabellen und Diagrammen sowie im Text werden die untersuchten Kontrollplasmen jeweils durch eine Kennzahl repräsentiert. Die Zuordnung der Kennzahlen zur genauen Bezeichnung der Qualitätskontrollplasmen findet sich im zweiten Kapitel unter dem Abschnitt 2.1. (Untersuchte Kontrollplasmen).

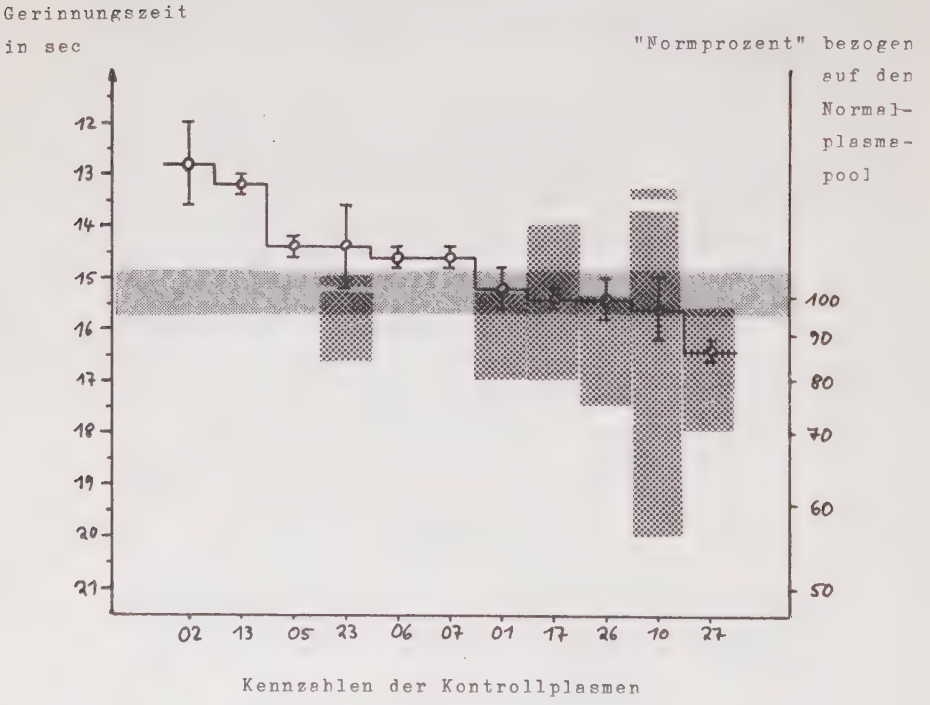
4.1. Ergebnisse der Gerinnungsanalysen

4.1.1. Einphasen-Thromboplastingerinnungszeiten nach Quick (Quick-Wert)

Alle Qualitätskontrollplasmen, zu deren Anwendungsgebiet nach Angaben des Herstellers auch die Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick gehört, wurden nach der unter 3.1.1. beschriebenen Methode mit dem humanen Hirnthromboplastin des Instituts untersucht, wobei jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die Mittelwerte dieser Doppelbestimmungen wurden über eine Eichkurve, die aus den Gerinnungszeiten (Vierfachbestimmungen) der Verdünnungen des Normalplasmas gebildet wurde, in "Normprozente" umgewandelt.
Im nachfolgenden Diagramm (Diagramm 1, Seite 34) werden für die Kontrollplasmen mit einer hohen Aktivität im Quick-Test Gerinnungszeiten, "Normprozente" sowie die von den Herstellern angegebenen Zielwertbereiche dargestellt. Dabei wird der 100-%-Wert des Normalplasmas gekennzeichnet durch den Mittelwert und die doppelten Standardabweichung der Vierfachbestimmung des unverdünnten Normalplasmas.
In diesem Bereich liegen vier (36 %) der elf im Diagramm 1 aufgeführten Kontrollplasmen. Sechs (55 %) Plasmen weisen eine höhere, eines (9 %) eine niedri-

gere Aktivität auf. Bei fünf (83 %) der sechs Kontrollplasmen, denen eine Zielangabe in Form einer Prozentaktivität beigegeben war, stimmte die gemessene Aktivität mit dieser Angabe überein.

Diagramm 1: Kontrollplasmen mit einer hohen Aktivität im Quick-Test



Legende zu Diagramm 1 (Seite 34):

: Mittelwert der Vierfachbestimmung des unverdünnten Normalplasmas plus/minus der zweifachen Standardabweichung

: Mittelwert der Doppelbestimmung für das Kontrollplasma plus/minus der zweifachen Standardabweichung

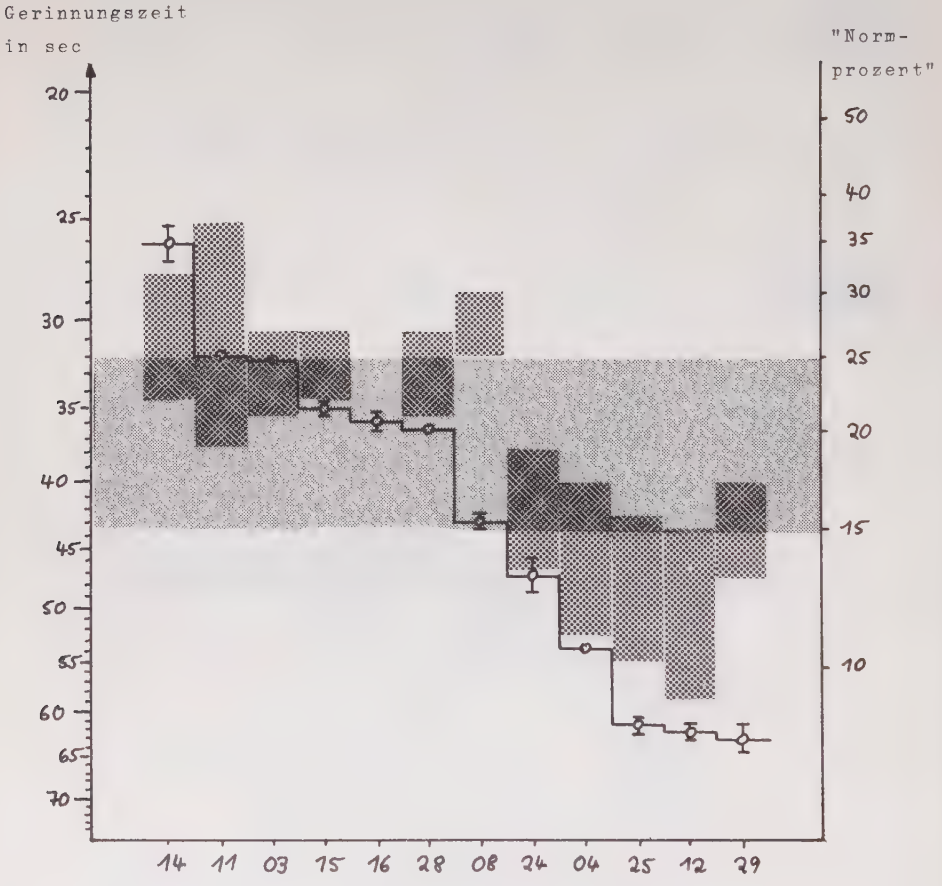
: vom Hersteller in der Arbeitsvorschrift aufgeführter Zielwertbereich, angegeben für das Thromboplastin:

Thromborel^{R} bei Plasma 23, 01 und 17
Simplastin^{R} bei Plasma 10
Calcium-Thromboplastin (bio Mérieux) bei Plasma 05, 06 und 07
Calcium-Thromboplastin (Roche) bei Plasma 13
für Reagentien der Firma Boehringer bei Plasma 26 und 27

Der Zielwertbereich von Plasma 17 geht bis 120 %, während derjenige von 23 und 10 bis > 100 % bzw. > 150 % reicht. Für die Plasmen 13, 05, 06 und 07 ist als Zielwert der Normalbereich (100 %) angegeben; dem Plasma 02 ist kein Zielwert beigegeben (nur für die Präzisionskontrolle).

Falls für mehrere Thromboplastine ein Zielwertbereich angegeben war, wurde derjenige für Thromborel^{R} gewählt, da dieses ein dem benutzten humanem Hirnthromboplastin ähnliches Reagenz ist.

Diagramm 2: Kontrollplasmen mit einer pathologischen Aktivität im Quick-Test



Legende zu Diagramm 2 (Seite 36):

: Therapeutischer Bereich für die orale Antikoagulation bei der Therapieüberwachung mit dem institutseigenen humanen Hirnthromboplastin

: Mittelwert der Doppelbestimmung für das Kontrollplasma plus/minus der zweifachen Standardabweichung (falls 2 s $\leq$ 0,1 Sekunden, ohne Standardabweichung)

: vom Hersteller in der Arbeitsvorschrift aufgeführter Zielwertbereich, angegeben für das Thromboplastin:

Thromborel^{R} bei 03, 04, 15, 24 und 25
Simplastin^{R} bei 11 und 12
Calcium-Thromboplastin (bio Mérieux) bei 08
Calcium-Thromboplastin (Roche) bei 14
für Reagenzien der Firma Boehringer bei Plasma 28 und 29

Das Plasma 16 hat keinen Zielwertbereich (zur Präzisionskontrolle im Therapiebereich). Auch hier wurde die Zielangabe für Thromborel^{R} angegeben, wenn für mehrere Thromboplastine Sollwertangaben vorhanden waren.

In Diagramm 2 (Seite 36) werden in gleicher Weise, die Kontrollplasmen aufgeführt, die einen Quick-Wert im pathologischen Bereich haben. Der therapeutische Bereich für die orale Antikoagulation, der für die Therapieüberwachung durch den Quick-Test mit dem humanen Thromboplastinreagenz des Instituts gilt, ist dabei besonders hervorgehoben.

In diesem Bereich liegen sechs (50 %) der zwölf Kontrollplasmen mit pathologischer Aktivität, eines (8 %) hat eine höhere, fünf (42 %) haben eine niedrigere Aktivität. Bei zwei (18 %) der elf Kontrollplasmen liegen die gefundenen Quick-Werte in dem vom Hersteller angegebenen Zielwertbereich, bei einem (9 %) findet sich ein höherer, bei acht anderen (73 %) ein niedrigerer Quick-Wert.

Sowohl bei den Qualitätskontrollplasmen mit "normaler" als auch bei denen mit pathologischer Aktivität ist zu berücksichtigen, dass diese Zielwertbereiche nicht für das benutzte humane Hirnthromboplastin angegeben wurden, sondern für Thromboplastine mit anderen Eigenschaften.

4.1. 2. Partielle Thromboplastinzeiten (PTT)

Alle Kontrollplasmen, die auch zur Qualitätskontrolle der partiellen Thromboplastinzeit geeignet waren, wurden mit der unter 3.1.2. beschriebenen Methode (Pathromtin^{R} als partielles Thromboplastinreagenz) untersucht. Im folgenden Diagramm (Diagramm 3, Seite 41) sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen (aufgerundet auf Sekunden), die Standardabweichungen und Zielwertbereiche aufgeführt.

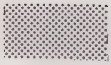
Bei sieben (41 %) der siebzehn untersuchten Kontroll-Plasmen findet man eine Gerinnungszeit zwischen 35 und 45 Sekunden (Normalbereich der Methode), während zwei (12 %) eine kürzere, acht (47 %) eine verlängerte partielle Thromboplastinzeit aufweisen. Bei den Plasmen mit pathologischer Aktivität kann man eine Gruppe von fünf mit einer auf ungefähr das Doppelte sowie eine von drei Plasmen mit einer auf etwa das Dreifache des "Normalen" verlängerten Gerinnungsaktivität unterscheiden.

Zwölf der siebzehn Kontrollplasmen (71 %) weisen partielle Thromboplastinzeiten auf, die in dem von den Herstellern angegebenen Zielwertbereich liegen, darunter alle sechs Plasmen mit Angaben für Pathromtin^{R}. Bei drei der Kontrollplasmen (18 %) mit Zielwertangaben für andere partielle Thrombplastinreagenzien liegt die ermittelte Gerinnungszeit nicht in diesem Bereich. Die partielle Thromboplastinzeit des Normalplasmas aus dem Institut liegt im Normalbereich der angewandten Methode.

Legende zu Diagramm 3 (Seite 41):

: Normalbereich der angewandten Methode

: Mittelwert der Doppelbestimmung (auf Sekunden aufgerundet) plus/minus der zweifachen Standardabweichung (falls > 0,5 Sekunden), sonst ohne Angabe der Standardabweichung



: vom Hersteller angegebener Zielwertbereich für folgende partielle Thromboplastine:

Pathromtin^{R} bei Plasma 01, 03, 04, 23, 24, und 25

Platelin^{R} Plus Activator bei Plasma 10, 11 und 12

PTT-Reagenz (Roche) bei Plasma 13

für Reagenzien der Firma Boehringer bei Plasma 26, 30 und 31

für die PTT-Methode Immuno bei Plasma 18 und 19

Für das Plasma 07 ist der "Normalbereich" als Zielwert angegeben. Das Plasma 02 dient zur Präzisionskontrolle (ohne Wertangabe).

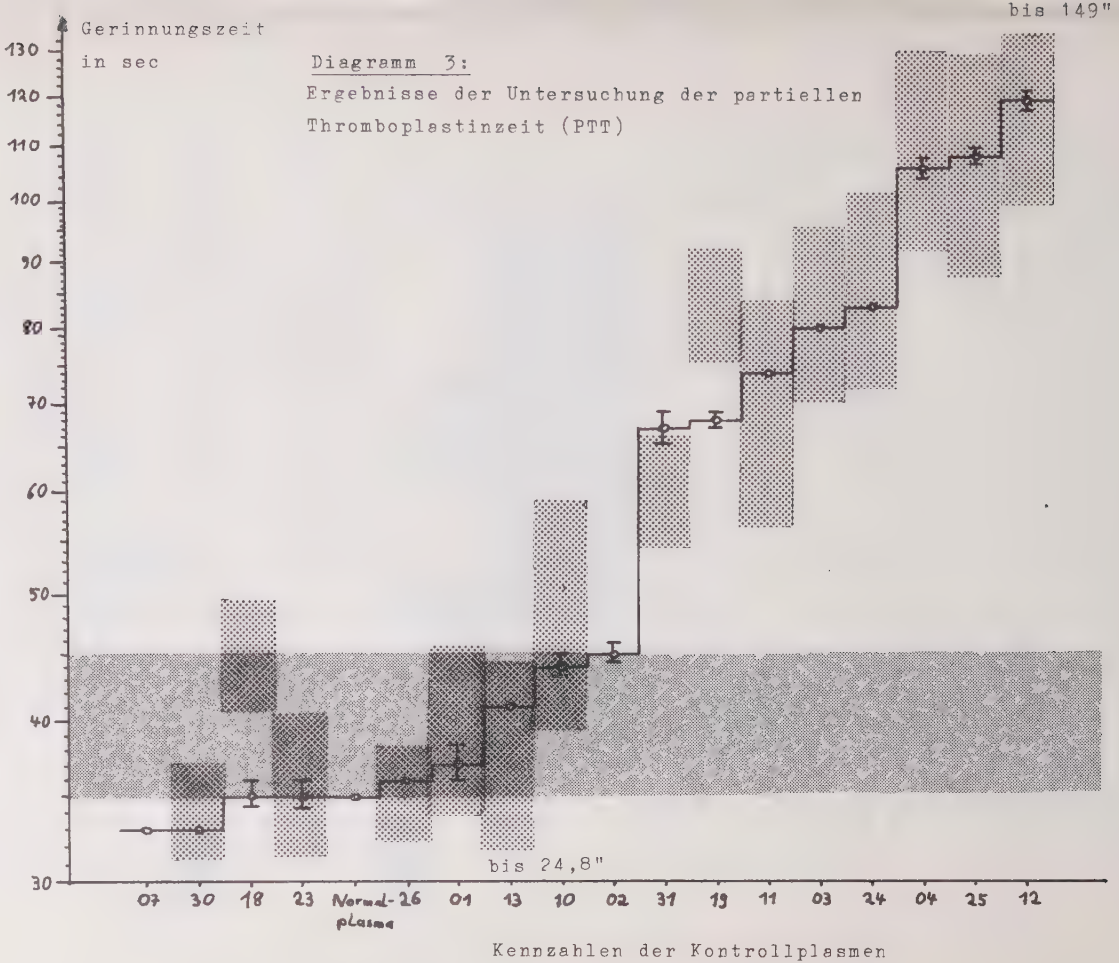


Diagramm 3:
Ergebnisse der Untersuchung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT)

4.1. 3. Thrombinzeiten

Acht der 35 untersuchten Kontrollplasmen wurden von den Herstellern für die Kontrolle der Thrombinzeit empfohlen. Das Diagramm 4 auf der folgenden Seite stellt die Ergebnisse zusammen.
Von den acht untersuchten Qualitätskontrollplasmen besitzen sieben (88 %) Thrombinzeiten im Normalbereich der Methode, einschließlich des Normalplasmas, während eines (12 %) eine verlängerte Gerinnungszeit aufweist. Die gefundenen Thrombinzeiten finden sich innerhalb der vom Hersteller angegebenen Zielbereiche, auch wenn diese nicht für das benutzte Test-Thrombin galten. Bei Plasma 13 weicht die gemessene Thrombinzeit stark von der Zielangabe des Herstellers ab (in Diagramm 4 nicht eingezeichnet). Gründe für diese Abweichung werden im Abschnitt 5.1.3. diskutiert.

Legende zu Diagramm 4 (Seite 43):

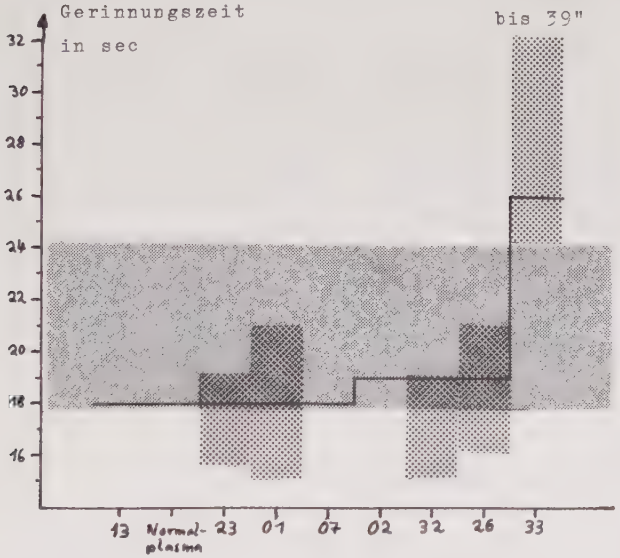
▒▒▒ : Normalbereich der Methode

——— : Mittelwert der Doppelbestimmungen (auf Sekunden aufgerundet); Standardabweichung nicht eingezeichnet, da alle < 0,3 Sekunden

▒▒▒ : Zielwertbereich nach Angaben der Hersteller für das Reagenz:
Test-Thrombin bei Plasma 23 und 01
Reagenzien der Firma Boehringer bei Plasma 32, 26 und 33
Für die Plasmen 07 und 02 gibt es keine Ziel-

wertangaben. Für das Plasma 13 wird als Zielwert eine Thrombinzeit von 9,9 sec (8,4 bis 11,4 sec) vom Hersteller angegeben.

Diagramm 4: Ergebnisse bei der Untersuchung der Thrombinzeit



Kennzahlen der Kontrollplasmen

4.1. 4. Faktor-II-Bestimmungen

Die drei von den Herstellern hierzu zugelassenen Kontrollplasmen wurden mit der unter 3.1.4. beschriebenen Methode untersucht. In der Tabelle 1 sind für die 1 : 20 Verdünnungen der Proben die Mittelwerte

der Gerinnungszeiten (Doppelwerte), die Standardabweichung, die "Normprozente" bezogen auf das Normalplasma des Instituts und die Zielwerte aufgeführt. Während ein Plasma eine Aktivität im Normalbereich aufweist, haben die beiden anderen eine pathologische Aktivität. Als Zielwertangaben sind grobe Umschreibungen angegeben.

Tabelle 1: Faktor-II-Aktivitäten der Kontrollplasmen

Kennzahl	Mittelwert	Standardabweichung s	"Normprozent"	Zielwertbereich
25	72,2 sec	0,4 sec	7 %	1)
16	37,6 sec	0,1 sec	28 %	2)
17	21,8 sec	0,1 sec	90 %	3)

1) pathologischer Bereich
2) Aktivitätsbereich der oralen Antikoagulation
3) Normalbereich

4.1. 5. Faktor-V-Bestimmungen

Bei der Austestung der beiden Kontrollplasmen (Doppelbestimmungen) mit der unter 3.1.5. dargestellten Methode ergeben sich für die 1 : 20 Verdünnung die in Tabelle 2 aufgeführten Ergebnisse.
Beide Kontrollplasmen besitzen eine Faktor-V-Aktivität im Normalbereich. Die genaue Zielwertangabe (100 %) bei Plasma 22 wird nicht erreicht (90 %).

Tabelle 2: Faktor-V-Aktivitäten der Kontrollplasmen

Kennzahl	Mittelwert	Standardabweichung s	"Normprozent"	Zielwertbereich
17	30,9 sec	0,4 sec	96 %	Normalbereich
22 1)	31,5 sec	0,0 sec	90 %	100 %

1) Lyophilisat aufgelöst in 0,80 ml Aqua destillata

4.1. 6. Faktor-VII-Bestimmungen

Die vier Plasmen, die nach Angabe des jeweiligen Herstellers zur Kontrolle der Faktor-VII-Bestimmung geeignet sind, wurden mit der in Abschnitt 3.1.6. dargestellten Methode untersucht, und in ihrer Aktivität auf das Normalplasma des Instituts bezogen. Bei einer Probenverdünnung von 1 : 20 wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Ergebnisse erhalten. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 3: Faktor-VII-Aktivitäten der Kontrollplasmen

Kennzahl	Mittelwert	Standardabweichung s	"Normprozent"	Zielwertbereich
22 1)	28,4 sec	0,2 sec	100 %	100 %
17	29,6 sec	0,4 sec	90 %	Normalbereich
16	43,9 sec	0,7 sec	22 %	2)
25	58,5 sec	0,4 sec	8 %	3)

1) Lyophilisat aufgelöst in 0,80 ml Aqua destillata
2) Aktivitätsbereich der oralen Antikoagulation
3) pathologischer Bereich

Zwei der vier Kontrollplasmen haben eine Aktivität im Normalbereich der Methode, zwei eine pathologische. Nur für das Plasma 22 wird ein genauer Zielwert angegeben, der auch erreicht wird.

4.1. 7. Faktor-VIII-Bestimmungen

Die Prozentaktivitäten bei der Faktor-VIII-Bestimmung nach der unter 3.1.7. aufgeführten Methode sind auf den Internationalen Standard für Faktor VIII bezogen. In der nachfolgenden Tabelle 4 werden die Ergebnisse der Doppelbestimmungen aufgeführt.

Tabelle 4: Faktor-VIII-Aktivitäten der Kontrollplasmen

Kennzahl	Mittelwert	Standardabweichung s	Aktivität in IU/ml[1]	Zielwertbereich (angegeben in IU/ml[1])
09	55,7 sec[2]	0,6 sec	1,80	1,1 [3]
NPL[4]	56,5 sec[2]	0,3 sec	1,44	-
17	60,1 sec[2]	0,4 sec	1,04	Normalbereich
34	54,2 sec[5]	0,1 sec	1,00	0,90 (0,82 - 0,99)[6]
20	66,8 sec[5]	0,6 sec	0,25	0,205
35	79,8 sec[5]	0,8 sec	0,08	0,14 (0,11 - 0,17)[6]

1) bezogen auf den Internationalen Standard für Faktor VIII
2) 1 : 10 verdünnt
3) angegeben für Reagenzien der Firma bio Mérieux
4) NPL = Normalplasma des Instituts
5) 1 : 5 verdünnt
6) angegeben für Reagentien der Firma Boehringer

Drei (60 %) der fünf Kontrollplasmen einschließlich des Normalplasmas weisen eine Faktor-VIII-Aktivität im Normalbereich der Methode (0,60 IU/ml bis 1,80 IU pro ml <9>) auf, zwei (40 %) besitzen pathologisch tiefe Aktivitäten. Bei vier (80 %) Plasmen wird ein genauer Zielwertbereich angegeben, der aber von keinem erreicht wird.

4.1. 8. Faktor-IX-Bestimmungen

Tabelle 5: Faktor-IX-Aktivität der Kontrollplasmen

Kennzahl	Mittelwert	Standardabweichung s	Aktivität in IU/ml[1]	Zielwertbereich (angegeben in IU/ml)[1]
NPL[2]	51,9 sec[3]	0,1 sec	1,20	-
09	52,4 sec[3]	0,1 sec	1,12	1,00[4]
17	52,6 sec[3]	0,1 sec	1,08	Normalbereich
34	52,7 sec[3]	0,0 sec	1,08	0,85 (0,75 - 0,95)[5]
16	56,6 sec[6]	0,3 sec	0,35	7)
21	58,8 sec[6]	0,3 sec	0,28	0,20
35	71,9 sec[6]	0,3 sec	0,09	0,12 (0,09 - 0,14)[5]
25	79,0 sec[6]	0,7 sec	0,06	8)

1) bezogen auf den Internationalen Standard für Faktor IX
2) NPL = Normalplasma des Instituts
3) 1 : 10 verdünnt
4) angegeben für Reagentien der Firma bio Mérieux
5) angegeben für Reagentien der Firma Boehringer
6) 1 : 5 verdünnt
7) Aktivitätsbereich der oralen Antikoagulation
8) pathologischer Bereich

In der vorangehenden Tabelle 5 werden die Ergebnisse der Doppelbestimmungen der Faktor-IX-Aktivität dargestellt. Die Prozentaktivitäten sind auf den Internationalen Standard für Faktor IX bezogen.
Im Normalbereich der Methode (0,60 IU/ml bis 1,40 IU pro ml <48>) finden sich die Faktor-IX-Aktivitäten des Normalplasmas sowie von drei (43 %) der sieben Kontrollplasmen. Vier Plasmen (57 %) weisen eine pathologische Aktivität auf. Genaue Zielwerte in Prozent sind für vier Kontrollplasmen angegeben, die aber nur bei einem Plasma exakt erreicht werden.

4.1. 9. Faktor-X-Bestimmungen

Bei der Austestung der vier hierfür geeigneten Plasmen (1 : 20 verdünnt, Doppelbestimmungen) ergaben sich die in Tabelle 6 aufgeführten Ergebnisse, wobei die Aktivitäten auf das Normalplasma des Instituts bezogen wurden.

Tabelle 6: Faktor-X-Aktivitäten der Kontrollplasmen

Kennzahl	Mittelwert	Standardabweichung s	"Normprozent"	Zielwertbereich
221)	39,0 sec	0,3 sec	100 %	100 %
17	46,0 sec	0,6 sec	72 %	Normalbereich
16	110,0 sec	2,5 sec	12 %	2)
25	168,7 sec	0,1 sec	5 %	3)

1) Lyophilisat aufgelöst in 0,85 ml Aqua destillata
2) Aktivitätsbereich der oralen Antikoagulation
3) pathologischer Bereich

Zwei Kontrollplasmen besitzen eine Aktivität im Normalbereich, zwei eine pathologische. Die genaue Zielangabe bei einem Plasma (22) wird erreicht.

4.1.10. Fibrinogenkonzentrationen

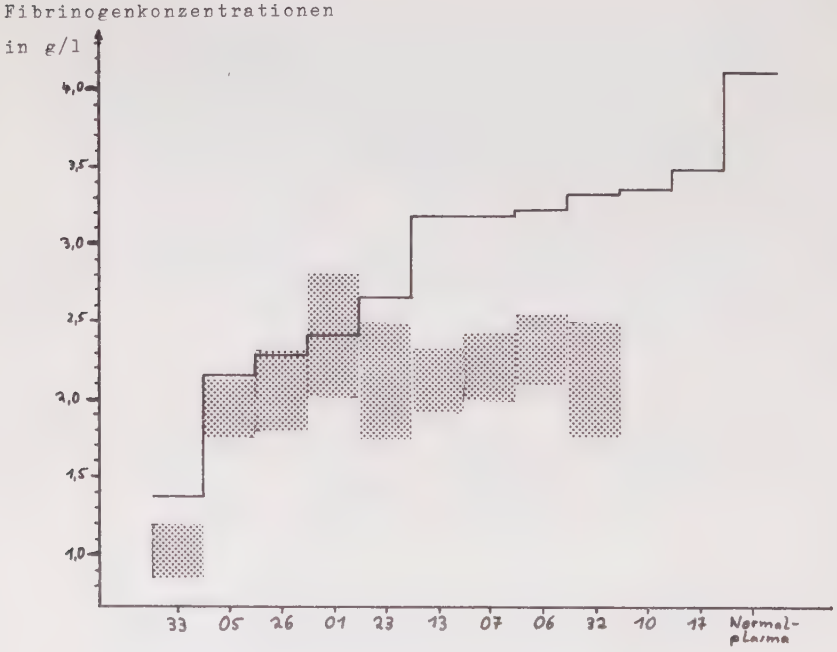
Die Fibrinogenkonzentrationen der Kontrollplasmen wurden mit der radialen Immundiffusion (Mancini-Technik) (siehe Abschnitt 3.1.10.) bestimmt. Dabei wurden Einzelbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Diagramm 5 dargestellt.
Elf der 35 untersuchten Qualitätskontrollplasmen eignen sich nach Herstellerangaben zur Kontrolle der Fibrinogenbestimmung. Von den Plasmen besaß nur eines eine Konzentration im pathologischen Bereich. Die Zielwerte sind bei allen Plasmen für gerinnungsphysiologische Untersuchungsmethoden (Methode nach Clauss) angegeben. Es zeigt sich, daß bei den neun Plasmen mit Zielwertangabe nur zwei (22 %) eine Fibrinogenkonzentration in diesem Bereich aufweisen, während bei allen anderen zum Teil bedeutend höhere Fibrinogenkonzentrationen gefunden werden.

Legende zu Diagramm 5 (Seite 50):

——— : Fibrinogenkonzentration (Einzelbestimmung)

▒▒▒ : vom Hersteller angegebener Zielwertbereich für gerinnungsphysiologische Methoden (Methode nach Clauss), jeweils angegeben für bestimmte Reagentien

Diagramm 5: Fibrinogenkonzentrationen der Kontrollplasmen



4.1.11. Antithrombin-III-Aktivitäten

Als einziges der untersuchten Kontrollplasmen war das Plasma 26 vom Hersteller zur Qualitätskontrolle der Antithrombin-III-Bestimmung zugelassen. Nach der unter 3.1.11. dargestellten Methode wurde eine Bestimmung dieses Plasma und des Normalplasmas durchgeführt.

Tabelle 7: Antithrombin-III-Aktivität des Kontrollplasmas 26 und des Normalplasmas des Instituts

Plasma	Ergebnis	Zielwertbereich
26	10,0 IU/ml	17 IU/ml (14,5 IU/ml bis 20 IU/ml)
NPL[1)]	12,2 IU/ml	-

1) NPL = Normalplasma des Instituts

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem vom Hersteller angegebenen Zielbereich und der gemessenen Antithrombin-III-Aktivität wird im Abschnitt 5.1.6. diskutiert.

4.2. Ergebnisse der klinisch-chemischen Untersuchungen

4.2. 1. Proteinkonzentrationen

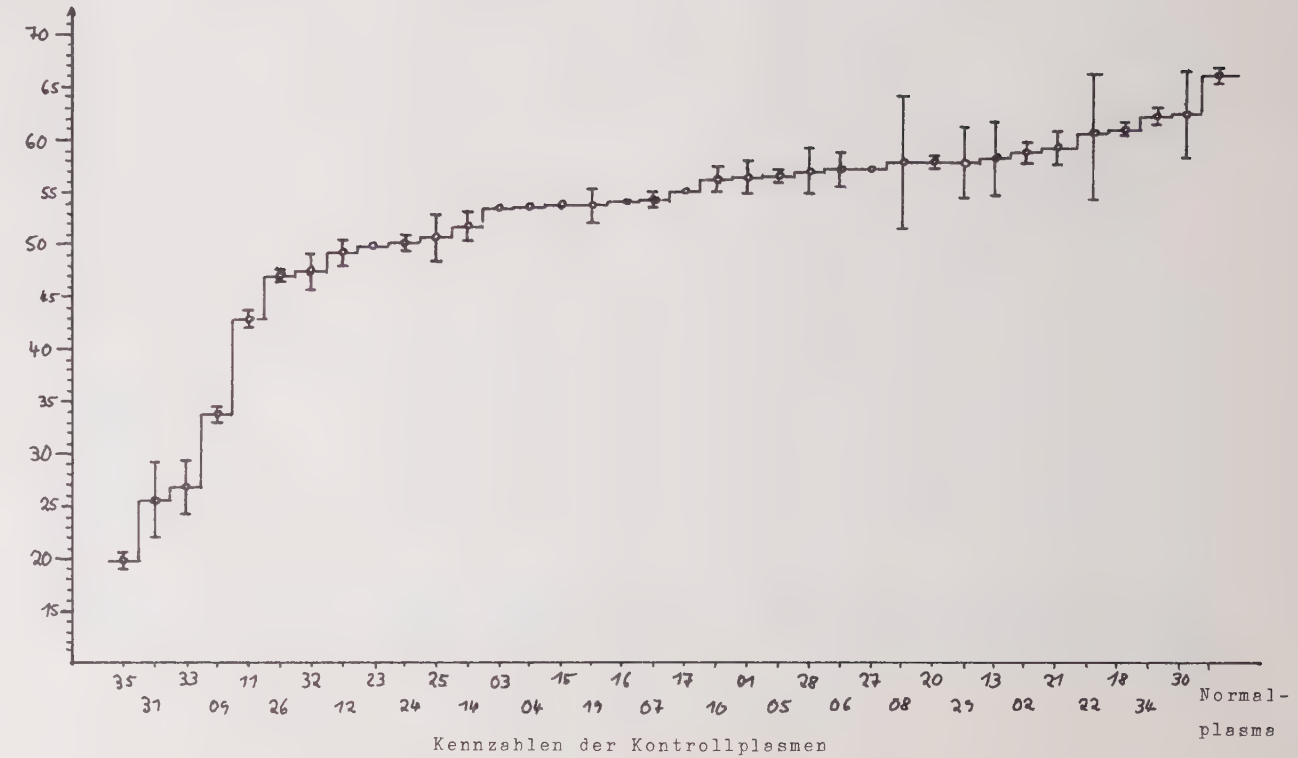
Im Diagramm 6 (Seite 53) sind die Ergebnisse der Doppelbestimmungen für den Proteingehalt aller 35 untersuchten Qualitätskontrollplasmen aufgeführt. Die gefundenen Werte liegen zwischen 19,8 g/l und 62,8 g/l im Mittel 52,0 g/l. Das Normalplasma des Instituts weist eine Proteinkonzentration von 66,5 g/l auf. Der Normalbereich für die Gesamteiweißbestimmung im Serum beträgt 62 bis 80 g/l <44>.

Legende zu Diagramm 6 (Seite 53):

: Mittelwert der Doppelbestimmung plus/minus der doppelten Standardabweichung, falls diese größer als 0,2 g/l ist.

: Mittelwert der Doppelbestimmung; Standardabweichung nicht angegeben, da $\leq$ 0,2 g/l

Diagramm 6: Proteinkonzentrationen der Kontrollplasmen



4.2. 2. Chloridionenkonzentrationen

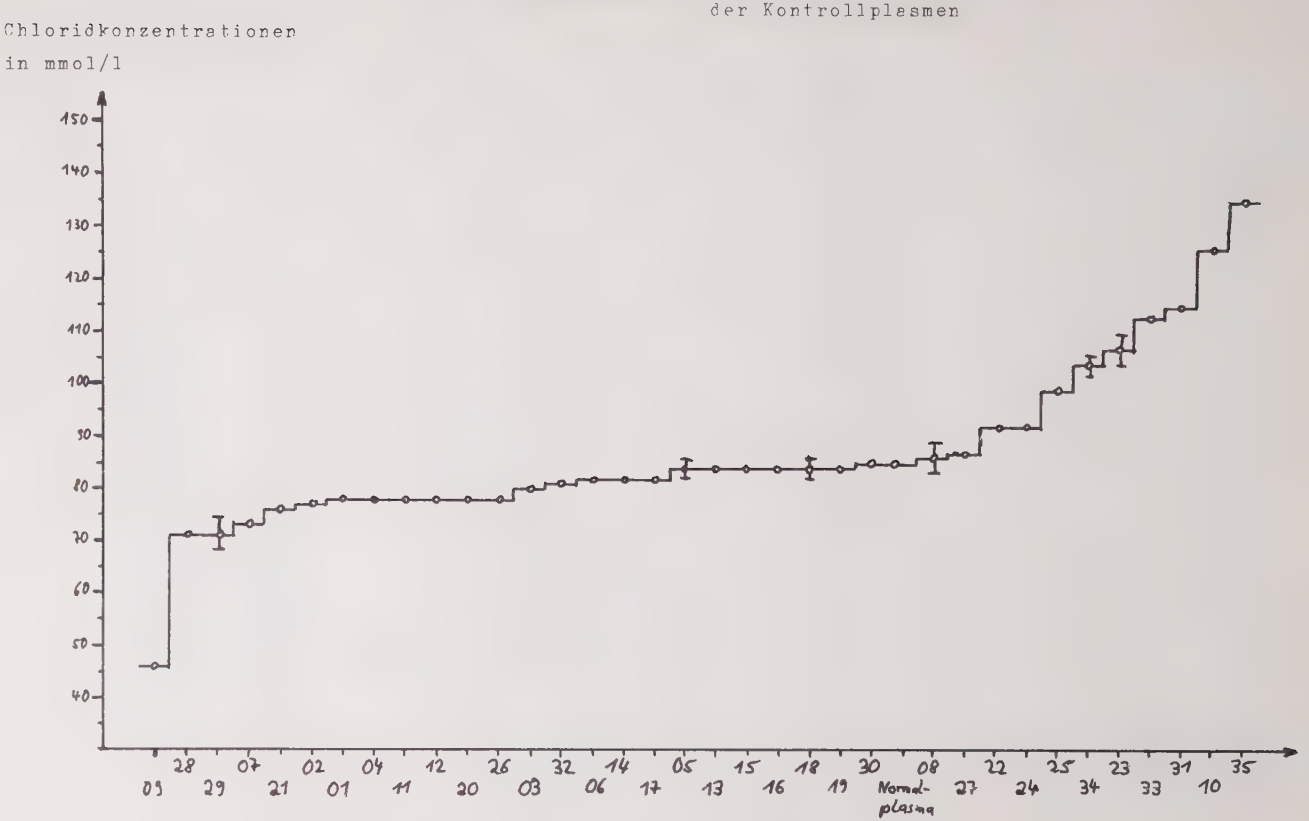
Die mit dem coulometrischen Meßverfahren bestimmten Chloridkonzentrationen aller Kontrollplasmen sowie des Normalplasmas (Doppelbestimmungen) finden sich in Diagramm 7 (Seite 55).
Die durchschnittliche Chloridionenkonzentration beträgt 87 mmol/l. Die meisten Kontrollplasmen besitzen eine Chloridionenkonzentration zwischen 70 mmol/l und 95 mmol/l, das Minimum liegt bei 46 mmol/l (Plasma 09), das Maximum mit 135 mmol/l für Plasma 35. Das Normalplasma des Instituts enthält 85 mmol/l. Der Normalbereich für die Chloridionenkonzentration im Serum reicht von 98 mmol/l bis 110 mmol/l <44>.

Legende zum Diagramm 7 (Seite 55):

: Mittelwert der Doppelbestimmung plus/minus der doppelten Standardabweichung, falls diese größer 1 mmol/l ist.

: Mittelwert der Doppelbestimmung, falls die Standardabweichung $\leq$ 1 mmol/l

Diagramm 7: Chloridionenkonzentrationen der Kontrollplasmen



4.2. 3. Konzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium

Diese Elektrolyte wurden mit einem Flammenphotometer bestimmt.

Die Natriumkonzentrationen der Kontrollplasmen (siehe Diagramm 8, Seite 57) liegen zwischen 110 mmol/l und 210 mmol/l bei einem Mittelwert von 164 mmol/l, der damit über dem Normalbereich für Serum (von 135 bis 150 mmol/l) <44> reicht.

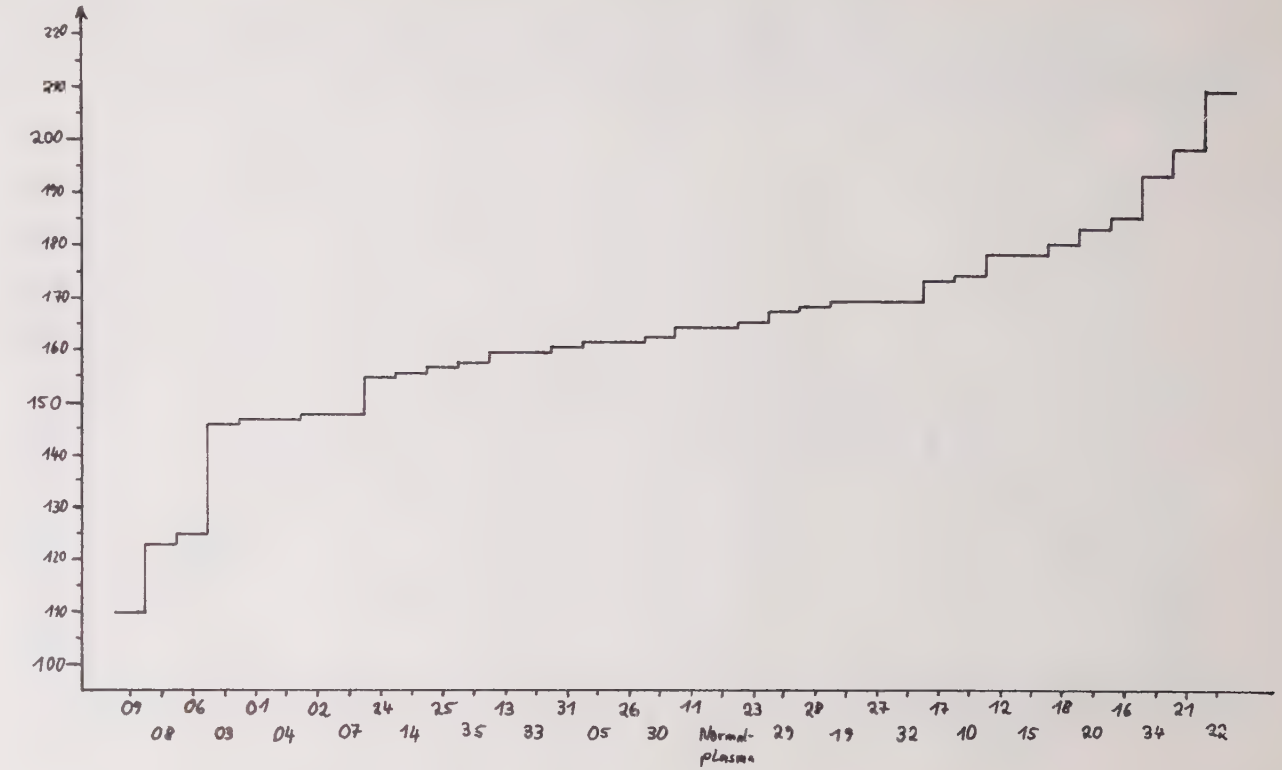
Die Kaliumkonzentrationen der Kontrollplasmen (im Mittel 4,3 mmol/l, ohne die Plasmen 08 und 06 3,4 mmol/l, siehe auch Diagramm 9, Seite 58) sind im allgemeinem unter dem Normalwert für Serum (3,6 mmol/l bis 5,2 mmol/l) <44>. Auffällig sind die extrem hohen Kaliumwerte der Plasmen 08 und 06 (18,1 mmol/l bzw. 18,6 mmol/l). Daneben gibt es Plasmen mit geringen Kaliumwerten von unter 3,0 mmol/l (Plasmen 09, 31, 33, und 35).

Die Calciumkonzentrationen (siehe auch Diagramm 10, Seite 59) sind mit durchschnittlich 1,7 mmol/l (Normalbereich für Serum 2,3 bis 2,8 mmol/l) <37> bei allen Plasmen ererniedrigt. Bei den meisten Plasmen werden Calciumkonzentrationen zwischen 1,7 und 2,3 mmol/l gemessen. Die Plasmen 06, 08, 09, 31, 33 und 35 weisen noch geringere Calciumkonzentrationen auf.

Legende zu den Diagrammen 8, 9 und 10 (Seite 57, 58 und 59):

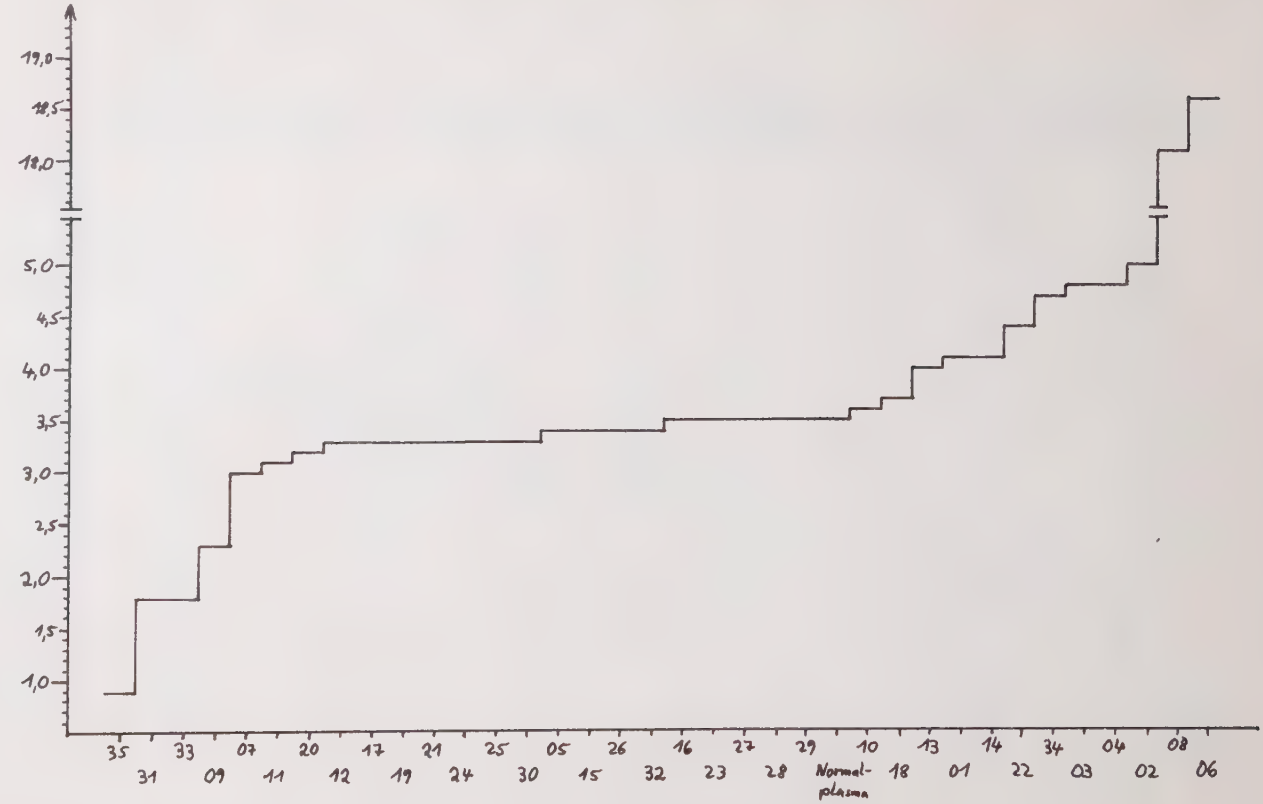
——— : Wert der Einfachbestimmung

Diagramm 8: Natriumkonzentrationen der Kontrollplasmen



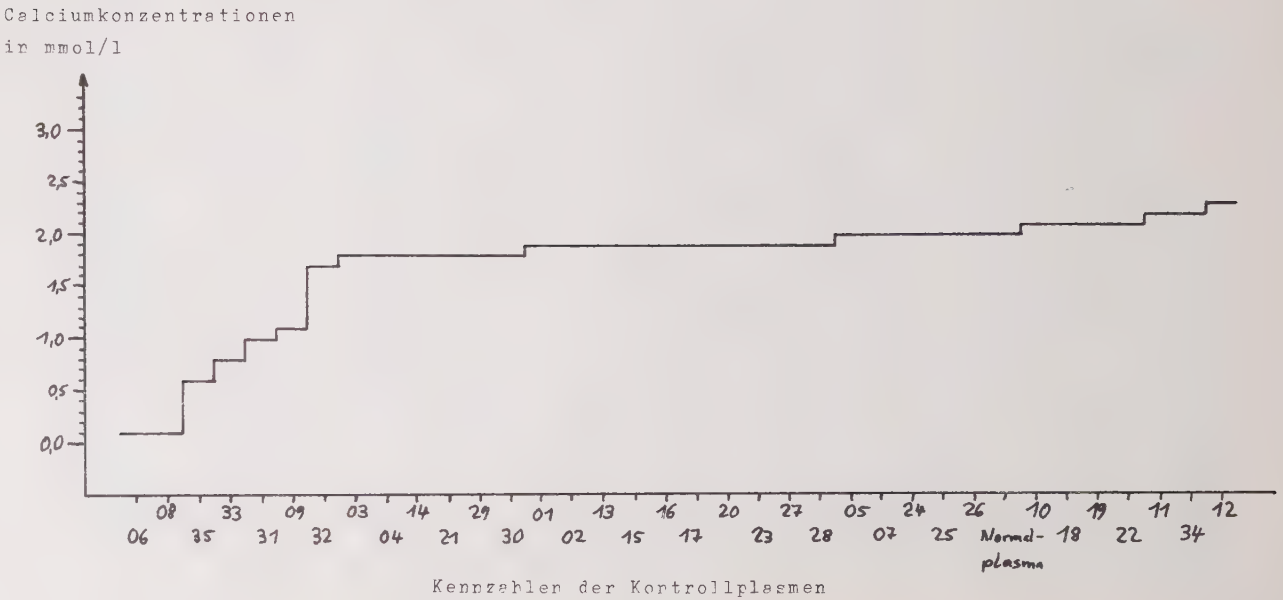
Kaliumkonzentration
in mmol/l

Diagramm 9: Kaliumkonzentrationen der Kontrollplasmen



Kennzahlen der Kontrollplasmen

Diagramm 1C: Calciumkonzentrationen der Kontrollplasmen



4.2. 4. Osmolalitätsbestimmungen

Die Osmolalitäten des Normalplasmas und der untersuchten Kontrollplasmen wurden mit der kryoskopischen Methode gemessen. Dabei wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichung gebildet wurden. Die Ergebnisse der Osmolalitätsbestimmungen sind im Diagramm 11 (Seite 61) aufgeführt.
Während bei zwei Plasmen (5 %) eine niedrige Osmolalität (09: 246 mosmol/kg H_2O, 06: 267 mosmol/kg H_2O) wurde und zwei Werte im Normalbereich für Plasma lagen (05: 276 mosmol/kg H_2O, 14: 300 mosmol/kg H_2O), besitzen alle anderen Kontrollplasmen (88 %) erheblich erhöhte Osmolalitäten (Maximum für Plasma 35 mit 914 mosmol/kg H_2O). Das zeigt sich am hohen Mittelwert alle Kontrollplasmen (472 mosmol/kg H_2O). Das Normalplasma des Instituts besitzt mit 320 mosmol/kg H_2O eine vergleichsweise mäßig erhöhte Osmolalität.

Legende zum Diagramm 11 (Seite 61):

: Mittelwert der Doppelbestimmung plus/minus der zweifachen Standardabweichung, falls diese > 10 mosmol/kg Wasser

: Mittelwert der Doppelbestimmung, wenn die zweifache Standardabweichung $\leq$ 10 mosmol/kg Wasser

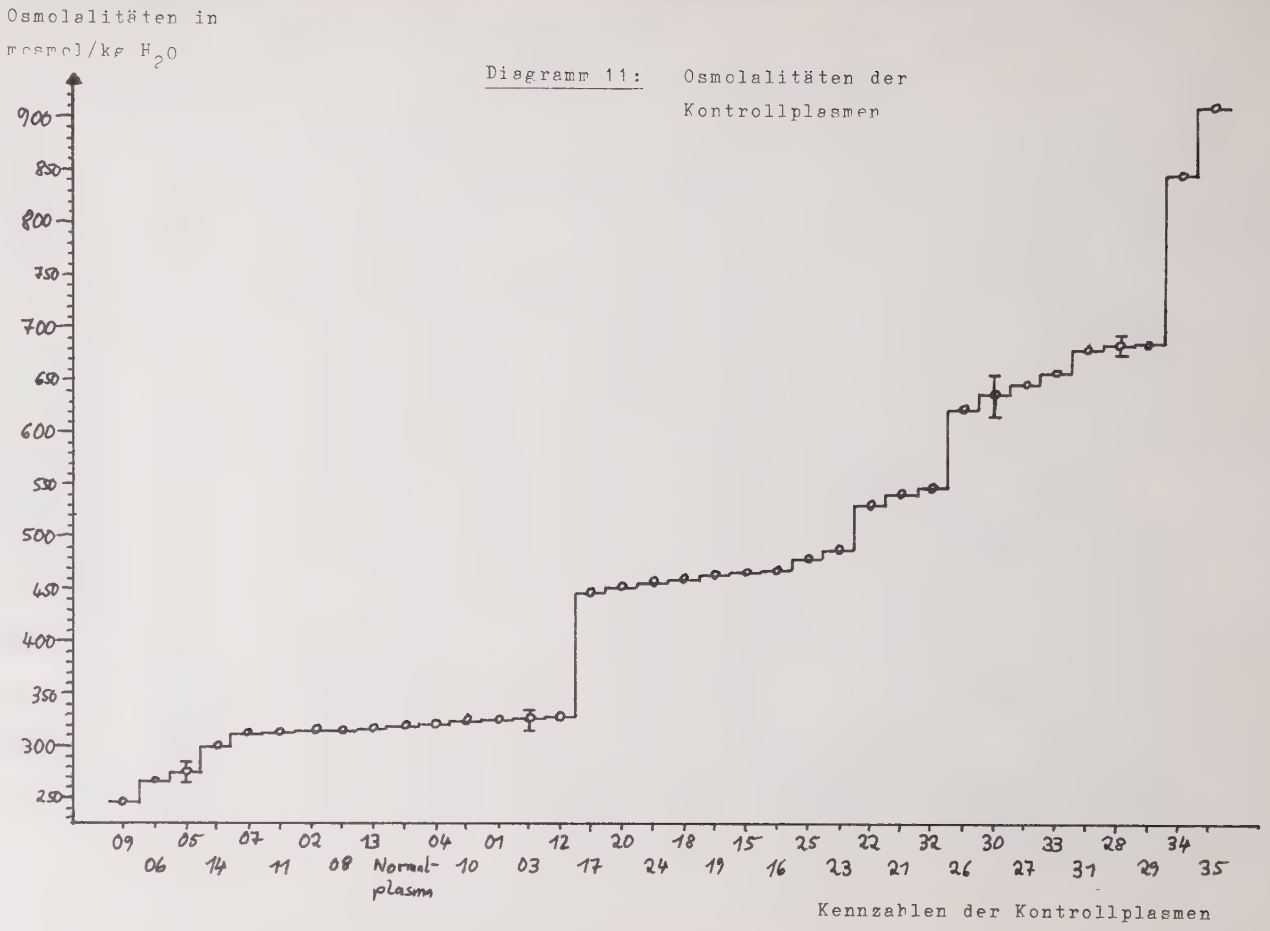


Diagramm 11: Osmolalitäten der Kontrollplasmen

4.2. 5. Bikarbonatkonzentrationen, Kohlendioxidpartialdrücke und pH-Werte

Die Bikarbonatkonzentrationen der Kontrollplasmen (Diagramm 12, Seite 63) besitzen einen Mittelwert von 5,1 mmol/l Bikarbonat, wenn man den aus dem Gesamtbild herausfallenden Wert des Plasmas 05 (34,4 mmol/l Bikarbonat) unberücksichtigt läßt. Die kleinste Bikarbonatkonzentration wurde bei Plasma 35 gemessen (1,3 mmol/l Bikarbonat). Das Normalplasma des Instituts hat eine Bikarbonatkonzentration von 9,2 mmol/l.

Die Kohlendioxidpartialdrücke der Kontrollplasmen liegen bis auf vier Ausnahmen unter 8 mm Hg. Der Mittelwert der Partialdrücke aller 35 Plasmen beträgt 6,2 mm Hg. Die Kontrollplasmen 01, 02, 03 und 04 besitzen höhere Kohlendioxidpartialdrücke als die anderen (16,2; 13,4; 16,4 bzw. 14,0 mm Hg). Das Normalplasma des Instituts weist mit 27,6 mm Hg den höchsten Partialdruck aller untersuchten Plasmen auf.

Die pH-Werte der meisten Plasmen (siehe Diagramm 13, Seite 64) liegen zwischen 7,2 und 7,8 bei einem Mittelwert von 7,5. Das Normalplasma des Instituts besitzt einen pH-Wert von 7,152. Der niedrigste pH-Wert wurde bei Plasma 35 (pH = 6,953), die höchsten bei den Plasmen 09 und 05 (pH = 8,234 bzw. 8,557).

Legende zu den Diagrammen 12 und 13 (Seite 63 und 64):

——— : Wert der Einfachbestimmung

Diagramm 12: Bikarbonatkonzentrationen der Kontrollplasmen

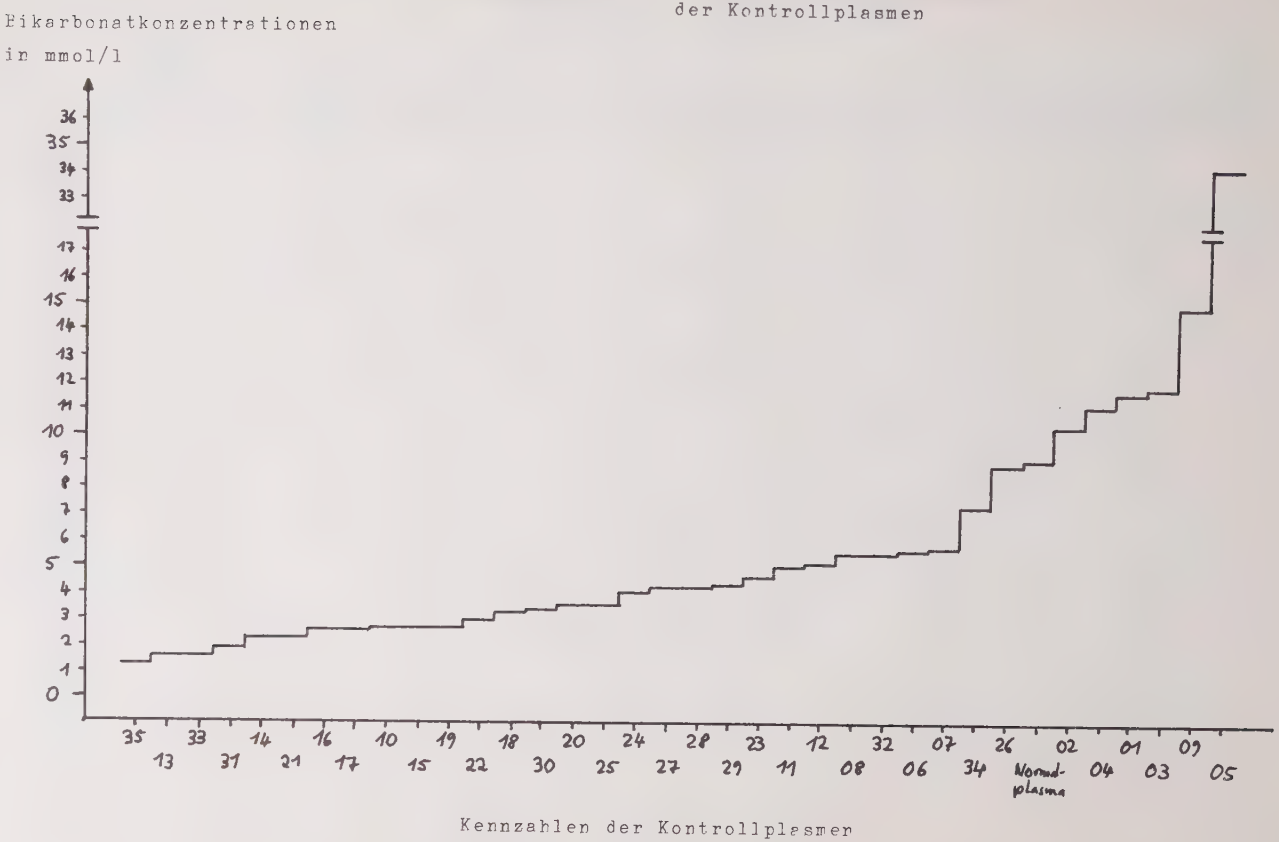
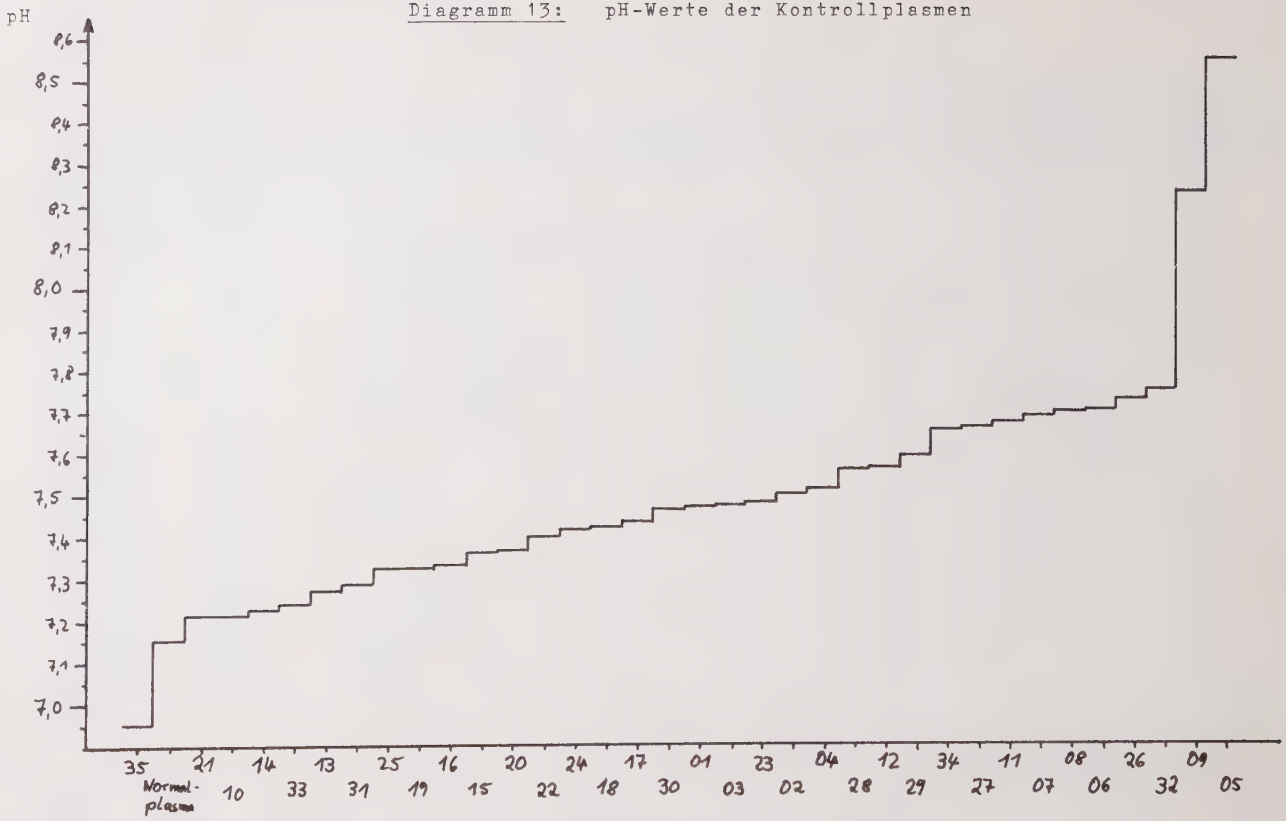


Diagramm 13: pH-Werte der Kontrollplasmen



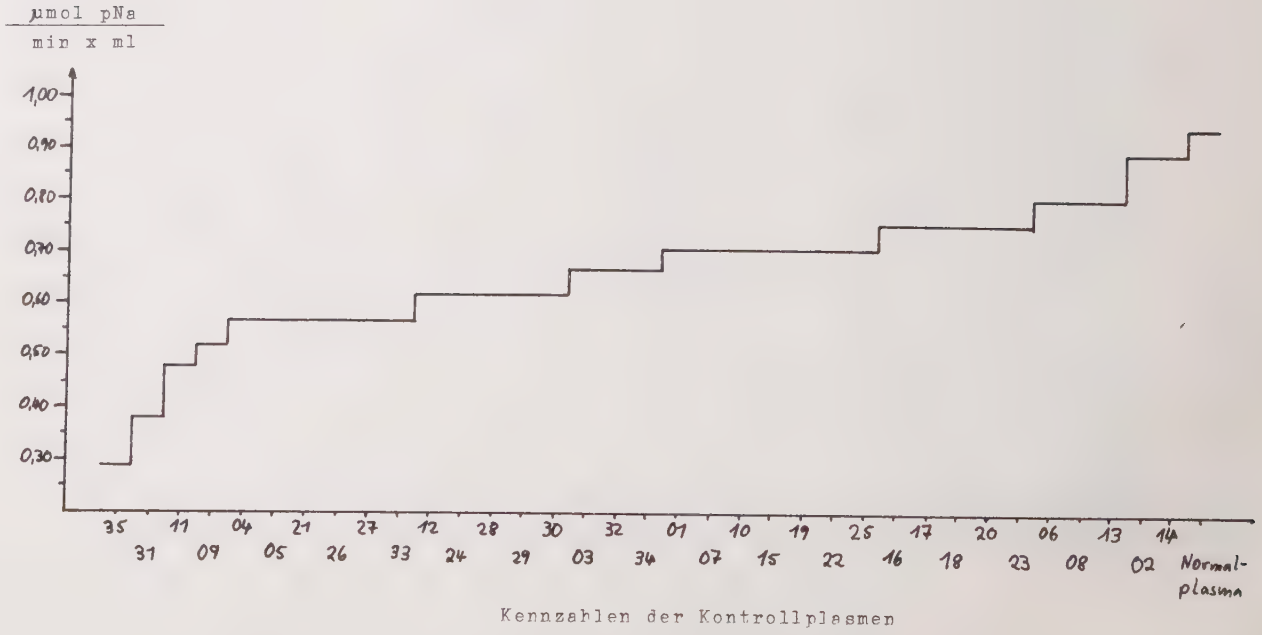
4.2. 6. Hydrolytische Aktivitäten mit S 2160 (Proteasennachweis)

Die hydrolytische Aktivität der Plasmen wurde mit dem Substrat S 2160 gemessen. Dabei ist der Umsatz von p-Nitroanilin pro Minute und Milliliter ein Maß für die Proteasenaktivität in der Probe. Aus den Ergebnissen, die in Diagramm 14 (Seite 66) aufgeführt sind, geht hervor, daß bei allen Kontrollplasmen sowie dem Normalplasma des Instituts ein nur geringer Umsatz von Substrat zu beobachten ist ($\leq$ 1 µmol p-Nitroanilin pro Minute und Milliliter).

Legende zum Diagramm 14 (Seite 66:

——— : Wert der Einzelbestimmung

Diagramm 14: Hydrolytische Aktivitäten der Kontrollplasmen mit S 2160 (Proteasennachweis)



5. Diskussion

5.1. Hämostaseologische Parameter

5.1.1. Thromboplastingerinnungszeit nach Quick (Quick-Wert)

Die Bestimmung der Einphasen-Thromboplastingerinnungszeit nach Quick dient als Screeningtest in der Untersuchung des exogenen Blutgerinnungssystems sowie zur Leberfunktionsdiagnostik und zur Therapieeinstellung der oralen Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten. Daraus folgt, daß mit diesem Test nicht nur eine Unterscheidung zwischen "normalen" und pathologischen Ergebnissen durchgeführt werden muß, sondern auch eine genaue Bestimmung im pathologischen Bereich (speziell im therapeutischen Bereich der oralen Antikoagulation), um eine Unterdosierung der Vitamin-K-Antagonisten mit der Gefahr thromboembolischer Komplikationen oder eine Überdosierung mit der Gefahr einer Blutung zu vermeiden.
Zur Qualitätskontrolle der Thromboplastinzeit muß deswegen ein Kontrollplasma mit "normaler" sowie eines mit pathologischer Aktivität (im therapeutischen Bereich) vorhanden sein <40>; manche Autoren <9> fordern zwei pathologische Kontrollplasmen, die eine Qualitätskontrolle im oberen und unteren Teil des therapeutischen Bereichs ermöglichen sollen. Vier der sieben Hersteller, von denen Kontrollplasmen untersucht wurden, bieten zwei Kontrollplasmen im pathologischen Bereich an.
Aus dem Diagramm 1 (Seite 34) mit den Ergebnissen der Kontrollplasmen mit einer hohen Aktivität im Quick-Test geht hervor, daß bei sechs Plasmen eine kürzere Thromboplastinzeit gemessen wurde als beim unverdünnten Normalplasmas plus/minus der zweifachen Standardabweichung. Für vier dieser sechs Plasmen (05, 06, 07

und 13) ist vom Hersteller eine Aktivität im Normalbereich angegeben, was eine Prozentaktivität von 100 % erwarten läßt. Ein möglicher Grund für diese Abweichungen ist das Fehlen eines Standards <11, 22, 47 und 50> für die Eichung der Thromboplastinzeit, weswegen diese gegen Poolplasmen gesunder Probanden geeicht wird, denen man definitionsgemäß eine Aktivität von 100 % zuordnet. Wegen der unterschiedlichen Aktivität von Plasmen gesunder Spender (<10>, nach G. Rogner <46> zwischen 60 % und 140 %) sind deutliche Unterschiede bei der Aktivität von gepoolten Normalplasmen möglich (100 % plus/minus 20 % nach G. Rogner <46>, Angabe von Beispielen aus <11>: 92 % bis 120 %). Eine solche Differenz zwischen dem vom Hersteller und dem in dieser Untersuchung benutzten Normalplasma könnte Abweichungen zwischen Zielwert und gemessener Gerinnungsaktivität erklären.

H. Beeser und andere <12> haben eine Studie zur Zuverlässigkeit der Thromboplastinzeitbestimmung durchgeführt. Sie begründen die Abweichungen zwischen den Laboren bei den Prozentaktivitäten der drei benutzten Kontrollplasmen unter anderen damit, daß Unterschiede bei den Eichkurven der verschiedenen teilnehmenden Labore existieren.

Im Diagramm 2 (Seite 36) mit den Ergebnissen der Kontrollplasmen im pathologischen Bereich der Thromboplastinzeit fällt auf, daß besonders bei den Plasmen mit einer deklarierten Aktivität im unteren Bereich des Therapieintervalls kleinere Prozentaktivitäten gemessen werden, als die Hersteller durch die Zielwerte angeben. P. Sommer und W. Hohenwallner <50> haben bei Ringversuchen in Österreich ähnliche Ergebnisse gefunden. Die Autoren führen als wahrscheinlichen Grund an, daß sie die Plasmaverdünnungen für die Bezugskurven mit Diäthyl-Barbiturat-Acetat-Puffer (genauso wie in dieser Untersuchung) anstatt mit physiologischer Kochsalzlösung, auf die sich die Ziel-

werte des Herstellers bezogen, ansetzten. Die beiden Autoren weisen darauf hin, daß Verdünnungen des Bezugsplasmas mit Puffer kürzere Gerinnungszeiten ergeben als solche mit physiologischer Kochsalzlösung. Tatsächlich geht aus den Arbeitsvorschriften der Plasmen 01 bis 08, 10 bis 12 und 23 bis 25 hervor, daß sich die Hersteller auf saline Verdünnungskurven beziehen. Auch M. Fischer <22> weist darauf hin, daß der Verlauf der Eichkurven für die Thromboplastinzeitbestimmung von der Art der Plasmaverdünnung (isotone Kochsalzverdünnung, gepuffert oder adsorbiertes gepuffertes Mangelplasma) abhängig ist.

Auch für den pathologischen Bereich ist zu berücksichtigen, daß sich die Prozentaktivitäten auf Normalplasmen beziehen, die keine konstante Aktivität aufweisen. Dadurch können auch im pathologischen Bereich Abweichungen zwischen Zielwerten und gemessenen Aktivitäten verursacht werden. H. Beeser und J. Fischer <11> haben mit einem tiefgefrorenem Plasma eines oral antikoagulierten Patienten an zehn verschiedenen Tagen Thromboplastinzeitbestimmungen durchgeführt, die zum einen auf ein tiefgefrorenes Normalplasma, zum anderen auf täglich neu erstellte Normalplasmen von jeweils zehn Spendern bezogen wurden. Die Prozentaktivitäten des Patientenplasmas bezogen auf das tiefgefrorene Normalplasma lagen für die zehn durchgeführten Bestimmungen zwischen 30 % und 32 %, mit den zehn frischen Normalplasmen jedoch zwischen 29 % und 40 %.

Weitere Frklärungen für Diskrepanzen zwischen Zielwerten und gemessenen Aktivitäten lassen sich möglicherweise aus den unterschiedlichen Eigenschaften der Thromboplastinpräparate <2, 3, 9, 22, 42, 47> ableiten. So fanden P. Averdunk und J. Grüner <3> bei der Untersuchung von acht oral antikoagulierten Patienten mit sechs verschiedenen kommerziellen Thromboplastinen (die aufgeführten Werte für Thrombotest und

Russel's Viper Venom werden hier nicht berücksichtigt) je nach Reagenz für jedes Plasma verschiedene Ergebnisse. Dabei war die höchste Prozentaktivität im Mittel um 11,9 % höher als die niedrigste. Da in sieben von acht Fällen die höchste beziehungsweise niedrigste Aktivität mit jeweils demselben Thromboplastin gemessen wurde, ist der Einfluß der unterschiedlichen Methoden, insbesondere der Thromboplastine, offensichtlich. Dies kann erklären, warum Zielwerte der Kontrollplasmen, die für bestimmte Thromboplastine angegeben sind, mit dem humanen Hirnthromboplastin des Instituts nicht erreicht werden (besonders deutlich bei Plasma 14).

In den Arbeitsvorschriften der Kontrollplasmen 15, 17, 23, 24 und 25 sind für verschiedene Thromboplastine unterschiedliche Zielbereiche angegeben, die zum Teil deutlich voneinander abweichen. Dies weist darauf hin, daß nur dann eine "Richtigkeitskontrolle" (besser Zielwertkontrolle, da die Thromboplastinzeitbestimmung wie alle gerinnungsphysiologische Methoden schlecht zu standardisieren ist) möglich ist, wenn Kontrollprobe und Thromboplastin vom selben Hersteller stammen oder aufeinander abgestimmt sind <9, 10 und 39>.

Die große Diskrepanz zwischen Zielwertangabe (25 % bis 30 %) und gemessener Prozentaktivität (15 %) bei dem Plasma 08 ist möglicherweise auf einen Abfall der Konzentration des Faktors V zurückzuführen. Dieses ist nämlich ein Oxalatplasma. Von jenen ist bekannt, daß sie die Stabilität des labilen Faktors V schlechter gewährleisten als Citratplasmen <21>.

5.1.2. Partielle Thromboplastinzeiten (PTT)

Bei der Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (siehe Diagramm 3, Seite 41) liegen die gefundenen Gerinnungszeiten außer bei den Plasmen 18, 19 und 31 in den Zielbereichen, obwohl sich nur ein Teil dieser Angaben auf das hier benutzte partielle Thromboplastinpräparat Pathromtin^{R} bezogen. Die Diskrepanz bei den genannten Kontrollplasmen deutet jedoch darauf hin, daß auch diese Gerinnungsuntersuchung nicht ausreichend standardisiert ist <1, 27, 28 und 49>. Als Ursachen sind anzuschuldigen: unterschiedliche Inkubationszeiten, Aktivatoren, Aktivatorkonzentrationen, Heparin- und Faktorenempfindlichkeiten sowie zahlreiche Methodenmodifikationen <1, 27, 28, 41 und 49>. Aus diesen Gründen ist auch bei der partieller Thromboplastinzeit eine Zielwertkontrolle nur dann möglich, wenn Kontrollprobe und Reagenz vom selben Hersteller stammen oder auf einander abgestimmt sind <9, 10>.

5.1.3. Thrombinzeiten

Die Thrombinaktivität verschiedener Präparate kann in ihrer Aktivität auf Standards bezogen werden (Thrombinstandard des National Institute of Health: NIH-U; Thrombinstandard der Universität von Detroit: IOWA-U; Thrombinstandard der World Health Organization (WHO): IU <45>). Heute wird eigentlich nur noch die Internationale Einheit benutzt, die auf den Thrombinstandard der WHO bezogen ist.
Die Diskrepanz zwischen Zielwertbereich und gemessener Thrombinzeit beim Plasma 13 ist durch die höhere Thrombinaktivität, die sich bei der vom Hersteller benutzten Methode im Endvolumen des Ansatzes befindet, bedingt (3 NIH-U/ml statt 1 NIH-U/ml bei

der Messung mit Test-Thrombin^{R} oder mit der Boehringer Methode; berechnet aus Informationen aus den Arbeitsvorschriften zu den verschiedenen Kontrollplasmen).

5.1.4. Bestimmungen der Aktivitäten einzelner Faktoren

Bei der Bestimmung der Einzelfaktoren II, V, VII und X besteht wie bei der Thromboplastinzeit nach Quick das Problem, daß durch die Schwankungen der Aktivitäten der Normalplasmen (nach G. Rogner <46> um 20 %, nach den Beispielen von H. Beeser und J. Fischer <11> um etwa denselben Betrag) die Vergleichbarkeit von Ergebnissen eingeschränkt ist.
Wie schon im Abschnitt Ergebnisse dargestellt, ist nur für das Plasma 22 eine Prozentaktivität als Zielwert (100 %) angegeben, während für die anderen Kontrollplasmen grobe Umschreibungen zu finden sind ("Normalbereich", was eine Aktivität von 100 % erwarten läßt, "im Aktivitätsbereich der oralen Antikoagulation" oder "im pathologischen Bereich"). Eine Zielwertkontrolle ist wegen dieser ungenauen Angaben nicht möglich. Die vom Zielwert von 100 % leicht abweichende Faktor-V-Aktivität des Plasmas 22 von 90 % kann durch einen Aktivitätsverlust dieses labilen Faktors bedingt sein; es kann sich auch um einen zufälligen Fehler handeln, da die Abweichung nur gering ist.
Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Gerinnungsanalysen existieren für die Faktoren VIII <7 und 8> und IX <15> Internationale Standardpräparate mit definierten Aktivitäten, die in dieser Untersuchung zur Aufstellung der beiden Bezugskurven benutzt wurden. Bei den Ergebnissen fällt auf, daß das Normalplasma des Instituts eine hohe Faktor-VIII- (1,44 IU/ml) und -IX-Aktivität (1,20 IU/ml) besitzt. Diese Abwei-

chungen liegen zwar innerhalb des Schwankungsbereichs der beiden Faktoren bei gesunden Probanden (für Faktor VIII je nach Literaturstelle verschieden: von 0,45 IU/ml bis 2,00 IU/ml <14>; für Faktor IX von 0,60 IU/ml bis 1,40 IU/ml <48>). Sie sind jedoch größer als sie von H. Beeser und J. Fischer <11> für verschiedene Normalplasmapools in Beispielen (0,85 IU/ml bis 1,20 IU/ml für Faktor VIII) angegeben werden. Die hohe Faktor-VIII-Aktivität des Normalplasmas des Instituts ist durch die konservierende Wirkung des Hepes-Puffers zu erklären. Durch den niedrigen pH-Wert des Normalplasmas (siehe Abschnitt 2.2.3.) wird die beim Auftauen initial hohe Faktor-VIII-Aktivität konserviert. Die hohe Faktor-IX-Aktivität ist möglicherweise dadurch zu erkären, daß aus Zufall nur Plasmen zur Herstellung des Normalplasmas herangezogen wurden, die eine hohe Faktor-IX-Aktivität aufwiesen. Es ist unwahrscheinlich, daß ein Abfall der Aktivität der Internationalen Standards eine Rolle spielt, da die in der Literatur zu findenden Informationen den Standards nur sehr geringe Aktivitätsverluste pro Zeit zusprechen (Aktivitätsverlust für Faktor VIII < 0,02 % pro Jahr <8>, für Faktor IX < 0,4 % <15> bei korrekter Lagerung).

Obwohl Internationale Standards für die Faktoren VIII und IX schon vor mehreren Jahren (Faktor VIII: 1971 <7> und 1976 <8>; Faktor IX: 1976 <15>) aufgestellt wurden, bezieht nur ein Hersteller die Aktivität seines Kontrollplasmas (Plasma 09) ausdrücklich auf die WHO-Standards für Faktor VIII und IX. Alle anderen Hersteller geben die Aktivität ihrer Plasmen entweder durch ungenaue Umschreibungen ("Normalbereich", "pathologischer Bereich" etc.) oder in Prozentaktivitäten an, die sich wahrscheinlich auf ein Normalplasmen beziehen. Zur Standardisierung von Gerinnungsanalysen muß man fordern, daß existie-

rende Internationale Standardpräparationen benutzt werden, um die Aktivität von Qualitätskontrollplasmen festzulegen. Dadurch kann eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Bestimmungen erreicht werden, da die Ergebnisse der Internationalen Standardpräparationen aufgrund ihrer Definition methodenunabhängig sind.
Während die Zielwerte der anderen Kontrollplasmen um maximal 0,13 IU/ml verfehlt werden, wurde bei Plasma 09 eine Faktor-VIII-Aktivität von 1,8 IU/ml gemessen, obwohl der Hersteller für seine Methode 1,1 IU/ml angegeben hat. Eine Aktivierung des Plasmas scheidet als Erklärung aus, da der deklarierte Zielwert für die Faktor-IX-Bestimmung nur gering überschritten wird. Eine Veränderung des Plasmas durch Lagerung (wurde bei -80° C gelagert) ist unwahrscheinlich, da bei der bekannten Lagerungsinstabilität des Faktors VIII eher mit einem Aktivitätsverlust zu rechnen ist.

5.1.5. Fibrinogenkonzentrationen

Aus Diagramm 5 (Seite 50) gehen die erheblichen Diskrepanzen zwischen den Zielangaben der Hersteller für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss <18> und den gemessenen Konzentrationen mit der radialen Immundiffusion <35> hervor. Zum Teil findet man Meßwerte, die um bis zu 1,0 g/l Fibrinogen höher sind als angegeben (Plasma 07, 06, 13 und 32). Als Erklärung bietet sich das unterschiedliche Verhalten der beiden Testmethoden bei Anwesenheit von Fibrinogenspaltprodukten an. Diese täuschen bei der radialen Immundiffusion höhere Fibrinogenkonzentrationen vor <44>, während sie durch Störung der Aggregation von Fibrinmonomeren zu erniedrigten Konzentrationen bei gerinnungsphysiologischen Methoden <44> führen. Veränderungen

im Sinne einer Fibrinolyse würden also diese Diskrepanzen erklären können. Fibrinolytische Veränderungen der Plasmen sind aber unwahrscheinlich, da zum Beispiel die Thrombinzeit bei Plasma 07, 13 und 32 nicht verlängert ist. Möglicherweise sind die gemessenen Gerinnungszeiten bei der Methode nach Clauss bei hohen Fibrinogenkonzentrationen so kurz, daß es zu ungenauen Ergebnissen kommt, zumal dann der Meßtakt des Gerätes (0,5 sec beim Koagulometer nach Schnittger-Gross <29>) einen größeren Einfluß gewinnt.
Die unzureichende Standardisierung der Fibrinogenbestimmung zeigt sich in der Vielzahl der verwendenten Methoden (gerinnungsphysiologische, physikalisch-chemische und immunologische <32>). Nach Witt <52> führen diese aber fast alle zu Ergebnissen, die untereinander nicht korrelieren. So sind in der Arbeitsvorschrift von Plasma 23 für zwei Gruppen von Reagenzienherstellern verschiedene Analysensollwerte für die Methode nach Clauss angegeben (2,22 g/l beziehungsweise 1,99 g/l).

5.1.6. Antithrombin-III-Aktivitäten

Wie aus Tabelle 7 (Seite 51) hervorgeht, liegt die gemessene Antithrombin-III-Aktivität des Plasmas 26 außerhalb des Zielbereichs, für den aber keine Reaktionstemperatur angegeben ist. In der Literatur findet sich eine Arbeit <26>, die mit dem Testverfahren desselben Herstellers Referenzwerte für die Antithrombin-III-Aktivität ermittelt. Dabei werden die Untersuchungen für 25° C und 37° C Testtemperatur durchgeführt, wobei unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden. Rechnet man den Zielwertbereich des Plasmas 26 auf eine Reaktionstemperatur von 25° C um, unter der Annahme, daß er für 37° C angegeben war, so erhält man ein Zielintervall, in das die gemessene

Aktivität hineinfällt. Die Antithrombin-III-Aktivität des Normalplasmas stimmt mit 12,2 IU/ml mit dem Median des Referenzkollektivs aus der oben angegebenen Arbeit überein.
Dort ist die Inhibitoreinheit (IU) definiert als die Antithrombin-III-Aktivität, die eine Einheit Thrombin hemmt. Eine Internationale Einheit (WHO-U) ist die Antithrombin-III-Aktivität, die in einem Milliliter eines Normalplasmas enthalten ist. Ein Internationaler Standard für die Antithrombin-III-Aktivität ist nach T. B. Kirkwood und anderen <30> festgelegt, auf den man sich aber offensichtlich nicht bezogen hat. Man muß fordern, daß dieser Standard zur Kalibrierung von Kontrollplasmen benutzt wird, um eine verbesserte Standardisierung dieser Gerinnungsuntersuchung zu erreichen.

5.2. Klinisch-chemische Parameter

5.2.1. Protein-, Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chloridkonzentrationen

Da die Verwendung von Plasma anstelle von Serum ausser bei bestimmten Enzymaktivitätsbestimmungen wahrscheinlich keine wesentliche Resultatsänderungen bei der Bestimmung klinisch-chemischer Parameter verursacht <43>, kann man die Meßwerte der Kontrollplasmen mit den Normalwerten für die Konzentrationen von Fiweiß, Kalium, Calcium und Chlorid im Serum vergleichen, wobei zu berücksichtigen ist, daß die Zugabe der Antikoagulanslösung im Verhältnis 1 : 10 eine Verdünnung des Plamas um 10 % verursacht. Da es sich bei der Citratlösung um ein Natriumsalz handelt, kommt es zu einer Erhöhung der Natriumkonzentrationen in den antikoagulierten Plasmen, die bei der

üblichen Molarität des Trinatriumcitrats eine Steigerung der Konzentration um ungefähr 15 mmol/l bewirkt. Bei der Verwendung eines Natriumcitrat-Zitronensäurepuffer ist sie geringer. Beim Vergleich der Gesamteiweißkonzentrationen der Kontrollplasmen mit den Normalwerten für Serum ist neben der Verdünnung auch die Fibrinogenkonzentration der Proben zu berücksichtigen.

Vergleicht man die zu erwartenden Konzentrationen mit den tatsächlich gemessenen, so können nur die Plasmen mit über 60 g Eiweiß pro Liter eine unveränderte Proteinkonzentration besitzen (22, 18, 34 und 30). Die meisten Qualitätskontrollplasmen erscheinen danach verdünnt worden zu sein. Bei den Plasmen 11, 09, 33, 31 und 35 muß man sogar eine erhebliche Verdünnung annehmen. Die erniedrigten Proteinkonzentrationen von bestimmten Plasmen mit pathologischer Aktivität weisen darauf hin, daß die Plasmen mit Pufferlösung oder ähnlichem verdünnt wurden, bis die deklarierte Aktivität erreicht wurde. Diese Plasmen entsprechen damit in ihrer Zusammensetzung und Beschaffenheit nicht dem Untersuchungsgut, wie es die Bundesärztekammer <4> und R. Haeckel <24> fordern. Sie sind deshalb als Kontrollmaterialien ungeeignet.

Bei den meisten Kontrollplasmen ist die gemessene Kaliumkonzentration im zu erwartenden Bereich. Dagegen fällt auf, daß sowohl die Chlorid- als auch die Calciumkonzentration bei der Mehrzahl der Plasmen etwas niedriger ist, als zu erwarten wäre. Möglicherweise reichen die Anregungstemperaturen im Flammenphotometer nicht aus, um alle Chelate aus Calcium und Citrat vollständig zu aktivieren, so daß dadurch eine niedrige Calciumkonzentration vorgetäuscht wird.

Die Plasmen 08 und 06 besitzen kaum meßbare Calcium- (0,1 mmol/l), verminderte Natrium- (123 beziehungsweise 125 mmol/l) und nur wenig verminderte Chlorid- (86 bzw. 82 mmol/l) und Proteinkonzentrationen (58,2

bzw. 57,5 g/l), jedoch einen extrem erhöhten Gehalt an Kalium (18,1 bzw. 18,6 mmol/l). Es ist zu vermuten, daß beide Plasmen durch Zugabe einer Kaliumoxalatlösung ungerinnbar gemacht wurden, was die hohen Kaliumwerte sowie die im Gegensatz zu Citratplasmen herabgesetzten Natriumkonzentrationen erklären würde. Ein weiteres Indiz sind die sehr niedrigen Calciumwerte, da Oxalatplasmen fast kein ionisiertes Calcium enthalten. Gibt man nämlich in eine Blutprobe gut lösliche Oxalatsalze (zum Beispiel Kalium- oder Natriumoxalat), so bildet sich unlösliches Calciumoxalat, das ausfällt. Nach der Zentrifugation findet es sich mit den korpuskulären Blutbestandteilen im Bodensatz, weshalb das überstehende Plasma kein ionisiertes Calcium enthält. Während das Plasma 06 ausdrücklich als Oxalatplasma etikettiert ist, finden sich zu dem benutzten Antikoagulans bei Plasma 08 keine Angaben. Diese beiden Kontrollplasmen entsprechen nicht dem Untersuchungsgut der Gerinnungslaboratorien, da dort (wie auch im Institut in Düsseldorf) die Patientenplasmen mit Citratsalzen ungerinnbar gemacht werden. Oxalatplasmen werden bei Blutgerinnungsuntersuchungen kaum noch benutzt, da Citrat eine wesentlich bessere Konservierung der lagerungslabilen Faktoren V und VIII ermöglicht <21>. Tatsächlich findet man bei Plasma 08 eine wesentliche geringere Prozentaktivität in der Thromboplastinzeit als durch den Zielwert zu erwarten war.

Bei den Plasmen 31, 33 und 35 findet man hohe Osmolalitäten (zwischen 662 und 914 mosmol/kg H_2O) und Chloridkonzentrationen (zwischen 113 und 135 mmol/l), während die Konzentrationen der Proteine (zwischen 19,8 und 26,9 g/l), des Kaliums (zwischen 0,9 und 1,8 mmol/l) und des Calciums (zwischen 0,6 und 1,0 mmol/l) um bedeutend mehr als die Hälfte unter den erwarteten Werten liegen. Dabei weisen diese drei Plasmen Natriumkonzentrationen von 158 bis 161 mmol/l

auf, während die pH-Werte um den Neutralpunkt liegen (zwischen 6,953 und 7,288). Es handelt sich hierbei um Verdünnungen von Citratplasmen, die mit einer hypertonen Lösung verdünnt wurden und deren pH-Wert durch Zugabe eines Puffers eingestellt wurde.
Das Plasma 09 ist durch niedrige Konzentrationen der untersuchten Elektrolyte und des Eiweißes sowie durch eine niedrige Osmolalität und einen extrem hohen pH-Wert charakterisiert. Die hohen Aktivitäten der Faktoren VIII und IX beweisen, daß es sich nicht um eine reine Verdünnung handelt. Wahrscheinlicher ist, daß es sich um eine Verdünnung handelt, die mit Konzentraten der beiden Faktoren angereichert wurde. Der hohe pH-Wert deutet darauf hin, daß dieses Plasma nicht gepuffert wurde und deshalb wegen der Zerstörung des Bikarbonatpuffers bei der Lyophilisation weit in den alkalischen pH-Bereich gerät <17, 23, 54>.
Die hohe Natrium- (194 mmol/l) und Chloridkonzentrationen (104 mmol/l) des Plasmas 34 lassen sich durch eine Kochsalzverdünnung alleine nicht erklären, da die anderen Parameter nicht abgesunken sind. Um die sehr hohe Osmolalität dieses Plasmas erklären zu können, muß man vielmehr annehmen, daß eine hypertone Pufferlösung zugesetzt worden ist.

5.2.2. Osmolalitäten

Die Osmolalität eines Plasmas unterscheidet sich nach R. Richterich <43> nicht wesentlich von der des Serums, da der Hauptunterschied, das hochmolekulare Fibrinogen, nur wenig zur Osmolalität beiträgt. Die Osmolalitäten von Citratplasmen müssen jedoch über dem Werten für normales Serum (285 $\pm$ 8 mosmol/kg H_2O <43>, ähnliche Angabe nach E. B. Hendry <25>) liegen, da die üblicherweise benutzte Citrat-

lösung hyperton ist (nach E. B. Hendry hat eine 3,8-prozentige Trinatriumcitratlösung des Dihydrats eine Osmolalität von 352 mosmol/kg H_2O). Diagramm 15 (Seite 81) zeigt die Osmolalitäten der einzelnen Kontrollplasmen, denen die Summe der Konzentrationen der untersuchten Elektrolyte (Na^+, K^+, Ca^{++}, Cl^- und HCO_3^-) zugeordnet ist. Dabei ist zu beachten, daß keine einfache Beziehung zwischen der Molarität der Bestandteile einer Lösung und ihrer Osmolalität besteht. Man muß die verminderte Plasmawasserkonzentration, die durch Proteine und Lipide <42> verursacht wird, und den osmotischen Aktivitätskoeffizienten <42> berücksichtigen. Für Plasmaverhältnisse folgt daraus eine geringere Osmolalität als der Summe der Molaritäten entspricht. Das Diagramm zeigt, das die erhöhten Osmolalitäten der Plasmen mit den laufenden Nummern 15 bis 35 nicht durch hohe Konzentrationen der untersuchten Elektrolyte verursacht sind. Da Natrium, Kalium und Calcium auch die wesentlichen Kationen sind, die mit zugesetzten Salzen in die Plasmen gelangt wären, liegt es nahe anzunehmen, daß die hohen Osmolalitäten durch andere niedermolekulare Substanzen (Glycin, Glucose etc.) hervorgerufen werden, die den Plasmen zur Stabilisierung zugesetzt wurden.

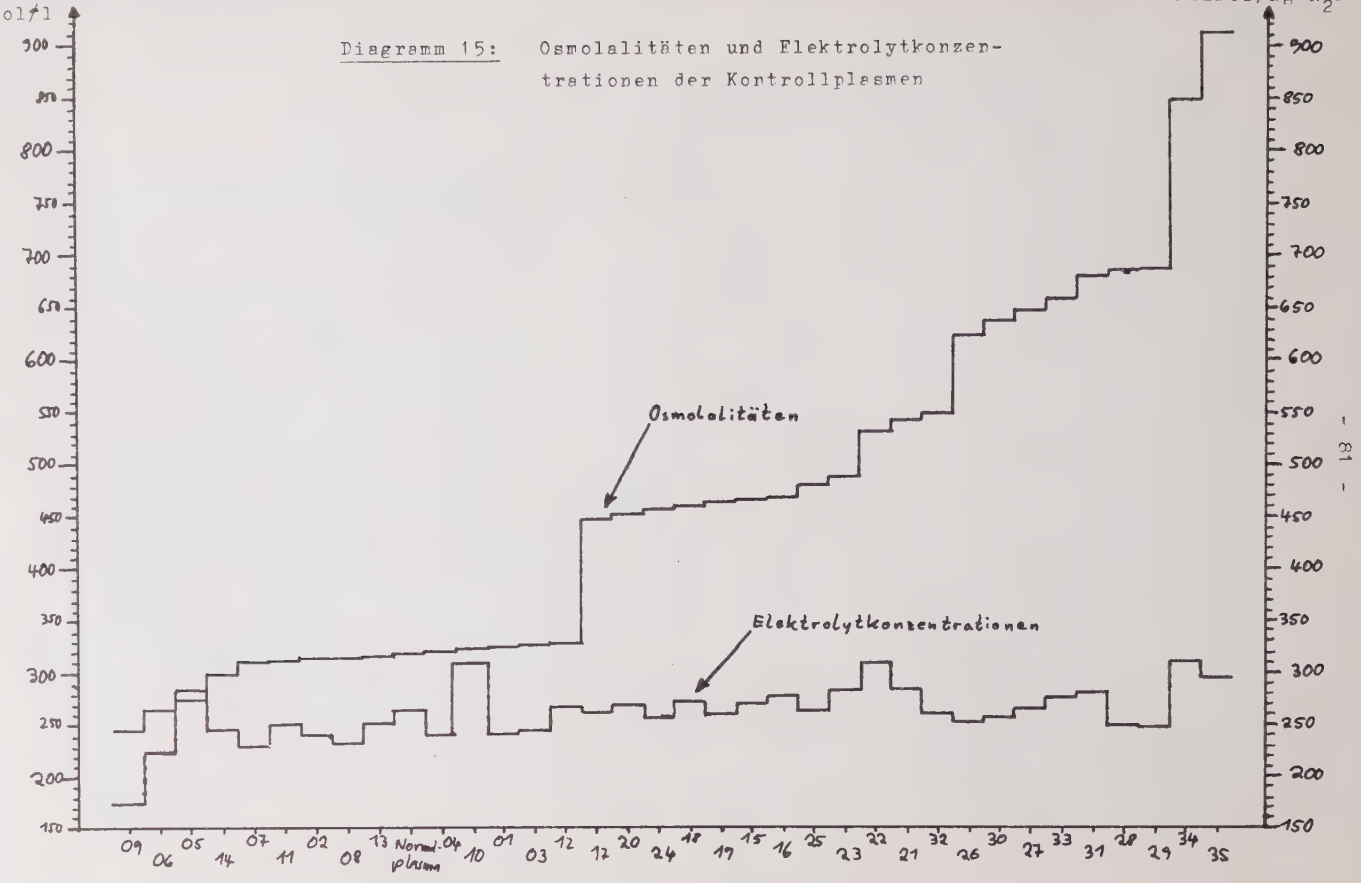
Legende zu Diagramm 15:

Osmolalitäten: Es sind die Meßwerte aus dem Diagramm 11 (Seite 61) angegeben.

Elektrolytkonzentrationen:

Es handelt sich um Werte, die durch Addition der Konzentrationen von Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid und Bikarbonat (siehe entsprechende Diagramme im Abschnitt Ergebnisse) erhalten wurden.

Diagramm 15: Osmolalitäten und Elektrolytkonzentrationen der Kontrollplasmen



5.2. 3. pH-Werte, Bikarbonatkonzentrationen, Kohlendioxidpartialdrücke und Pufferzusätze

Während der Lyophilisation von Plasmen entweicht das Kohlendioxid, wodurch der physiologische Bikarbonatpuffer zusammenbricht. Der Verlust dieses wichtigen Puffersystems führt bei der Rekonstitution der Lyophilisate zu alkalischen pH-Werten <23, 34>, wobei pH-Werte von 8,6 erreicht werden können <54>. Für präzise Gerinnungsanalysen sind diese pH- Werte zu hoch. Die enzymatischen Prozesse bei der Blutgerinnung werden beeinträchtigt: zum Beispiel ist die Geschwindigkeit der Thrombin-Fibrin-Reaktion pH-abhängig <18>. Nach F. S. Bigelow <13> verursacht ein Anstieg des pH-Wertes durch langes Stehen unverschlossener Proben eine deutliche Verlängerung der Thrombin-, Rekalzifizierungs- und Thromboplastinzeit, die jedoch durch Kohlendioxidbegasung in den ersten Stunden rückgängig gemacht werden kann, wie I. M. Chak und K. V. Giri <17> bewiesen.
Tatsächlich findet man bei allen Kontrollplasmen Kohlendioxidpartialdrücke, die deutlich unter den physiologischen im anaerob gewonnenen Blut liegen. Alle Kontrollplasmen, die einen annähernd physiologischen pH-Wert aufweisen, müssen während des Produktionsprozesses mit einer Puffersubstanz, wie zum Beispiel Hepes, versetzt worden sein. Aufgrund des hohen pH-Wertes der Plasmen 09 und 05 kann man annehmen, daß diese Plasmen keinen Puffer enthalten.

5.2.4. Hydrolytische Aktivitäten

Die hydrolytischen Aktivitäten der untersuchten Plasmen weisen alle einen Substratumsatz von $\leq$ 1 umol p-Nitroanilin pro min und ml Plasma auf. Damit besitzt keines der untersuchten Plasmen eine deutlich erhöhte Proteasenaktivität, die für unerwartete Ergebnisse in den Gerinnungsanalysen verantwortlich gemacht werden könnte. Die niedrigen hydrolytischen Aktivitäten der Plasmen 35, 31, 11 und 09 sind durch ihre geringen Proteinkonzentrationen bedingt.

5.3. Vorschläge für Qualitätskontrollplasmen für Blutgerinnungsanalysen

Qualitätskontrollplasmen für Blutgerinnungsanalysen müssen folgende Eigenschaften haben:

- humanes Plasma

  Ein Plasma menschlichen Ursprungs ist für alle immunologischen Untersuchungsverfahren zu fordern wie zum Beispiel der radialen Immundiffusion zur Bestimmung der Fibrinogen- oder Antithrombin-III-Konzentration. Für tierische Plasmen sprechen der geringe Preis und die Möglichkeit, einfacher große Chargen zu erstellen <23>, dagegen aber die Unvergleichbarkeit der Gerinnungssysteme. Ein Nachteil der humanen Plasmen ist die mögliche Kontamination mit Hepatitis-B-Viren <23>. Die Plasmen sollten deshalb mit hochempfindlichen Tests auf Abwesenheit von HB_SAg getestet werden wie es auch für das Referenzplasma für die Thromboplastinzeitbestimmung in der DIN-Norm 58.939 <20> gefordert wird.

- geringe Unterschiede zwischen Analysenmaterial und Kontrollplasmen

  Qualitätskontrollproben sollen dem zu analysierenden Material in ihrer Zusammensetzung möglichst ähnlich sein <4, 21, 23>. Das gilt besonders für Qualitätskontrollplasmen für Gerinnungsanalysen, da diese in hohen Maße störanfällig sind <9, 21>. Dies läßt auch hier wie in der klinischen Chemie <23> die Zugabe von Substanzen zur Konservierung der Kontrollplasmen fragwürdig erscheinen. Man muß deshalb fordern, daß Plasmen für die Kontrolle von Gerinnungstests den Citratplasmen möglichst ähnlich sind.

- pH-Wert und Pufferzusätze

  Da die enzymatischen Prozesse, die bei der Gerinnung ablaufen, pH-abhängig sind <33>, muß ein Qualitätskontrollplasma für Blutgerinnungsanalysen einen annähernd physiologischen pH-Wert besitzen. J. B. Miale und E. A. Loeliger <38> fordern für ein Referenzplasma einen pH-Wert von 7,4 $\pm$ 0,1. In der DIN-Norm 58.939 Teil 1 <20> wird für ein Referenzplasma für die vergleichende Thromboplastinzeitbestimmung ein pH-Wert von 7,4 bis 7,6 gefordert. Ein pH-Wert zwischen 7,0 und 7,6 scheint jedoch für Kontrollplasmen für Gerinnungsanalysen ausreichend zu sein.
  Da während des Produktions- und Lyophilisationsprozesses von Kontrollplasmen der physiologische Bikarbonatpuffer durch abrauchendes Kohlendioxid zusammenbricht, weisen nicht gepufferte Plasmen alkalische pH-Werte auf <23, 34, 54>. Um einen annähernd physiologischen pH-Wert der Kontrollplasmen zu gewährleisten, müssen diese gepuffert

werden. So ist zum Beispiel das Referenzplasma für die vergleichende Thromboplastinzeitbestimmung nach DIN-Norm 58.939 mit Hepes-Puffer versetzt. Nach S. Zucker <54> ist dieser Puffer zur Stabilisierung von Plasmen gut geeignet, da er erstens keine Calciumionen bindet und zweitens seine Säurekonstante pk_a (pk_a = 7,31 bei 37° C <54>) nahe am physiologischen pH-Wert liegt.

- Osmolalitäten

Die Osmolalitäten der Kontrollplasmen müssen denjenigen der untersuchten Citratplasmen möglichst ähnlich sein. J. B. Miale und F. A. Loeliger <38> fordern für Referenzplasemen ähnliche Osmolalitäten, wie sie bei frischen Patientenplasmen gefunden werden. Berücksichtigt man dabei, daß die gewöhnlich benutzte Citratlösung hyperton ist <25> und daß die Plasmen wegen des Zusammenbruchs des Biksrbonatpuffers während der Lyophilisation gepuffert werden müssen, so darf die Osmolalität der Kontrollplasmen nicht höher als 330 mosmol/kg H_2O sein.

- Natriumkonzentrationen

Die Natriumkonzentrationen der Referenzplasmen sollen im Vergleich zum Analysenmaterial nicht erhöht sein, da hohe Salzkonzentrationen einen Anstieg der Ionenstärke verursachen. Dadurch wird zum Beispiel die Fibrinogenbestimmung nach Clauss <18> verfälscht, da die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion von der Ionenstärke abhängig ist <18>. Als obere Grenze der Natriumkonzentration der Kontrollplasmen schlagen wir 180 mmol/l vor.

- Angaben über Zielbereiche

Den Kontrollplasmen müssen Zielwerte für die Gerinnungsanalysen beigegeben sein, die sich auf bestimmte Methoden und Reagenzien (insbesondere Thromboplastine) beziehen, da sich herausgestellt hat <9, 39>, daß im allgemeinen eine Zielwertkontrolle ("Richtigkeitskontrolle") nur möglich ist, wenn Kontrollprobe und Testverfahren aufeinander bezogen wurden. Um eine Zielwertkontrolle zu gewährleisten, müssen die Aktivitäten, Konzentrationen, Gerinnungszeiten etc. genau angegeben sein.

Zur Eichung der Qualitätskontrollplasmen müssen Internationale Standards angewandt werden, falls sie für die jeweiligen Parameter existieren:

- Antithrombin III <30>
- Plasmin <31>
- Thrombin <45>
- Faktor VIII <7, 8>
- Faktor IX <15>

Zur Eichung von Qualitätskontrollplasmen für die Thromboplastinzeitbestimmung nach Quick soll das Referenzplasma nach DIN 58.939 Teil 1 <20> benutzt werden, um die Gerinnungsaktivität 100 % klar zu definieren.

Ein weiterer Schritt auf dem Wege zu einer Standardisierung von Gerinnungsanalysen ist die Schaffung eines nationalen Referenzlaboratoriums für Gerinnungsanalysen, das die Sollbereiche der verschiedenen Qualitätskontrollplasmen festlegt.

6. Zusammenfassung

35 kommerzielle Qualitätskontrollplasmen wurden für jeden zu untersuchenden Gerinnungsparameter mit Hilfe einer einzigen Methode untersucht, um sie besser vergleichen zu können. Dabei wurden die Methoden benutzt, die vom Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin in Düsseldorf in der Routinediagnostik angewandt werden. Es wurden nur diejenigen Gerinnungsanalysen durchgeführt, für die das jeweilige Kontrollplasma vom Hersteller empfohlen war. Folgende Gerinnungstests wurden dabei durchgeführt:

- Thromboplastingerinnungszeit nach Quick
- partielle Thromboplastinzeit
- Thrombinzeit
- Fibrinogenkonzentrationen
- Bestimmungen der Aktivitäten der Faktoren II, V, VII, VIII, IX und X
- Bestimmung der Antithrombin-III-Aktivität

Zusätzlich wurden wichtige klinisch-chemische Parameter bei allen Kontrollplasmen untersucht:

- Proteinkonzentrationen
- Osmolalitäten
- Konzentrationen der Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid und Bikarbonat
- pH-Wert
- Kohlendioxidpartialdruck
- hydrolytische Aktivität mit dem Substrat S 2160

Das Normalplasma des Instituts wurde sowohl bei allen Gerinnungsanalysen als auch bei allen klinisch-chemischen Bestimmungen vergleichend mituntersucht. Es diente zur Aufstellung der Eichkurven bei den Faktorenanalysen. Dies gilt nicht für die Faktor-VIII- und -IX-Bestimmung, die auf In-

ternationale Standards bezogen wurden.

Folgende wichtige Punkte sind hervorzuheben:

1. Sechs von elf Kontrollplasmen für die Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick (Normalbereich) weisen kürzere Gerinnungszeiten auf als das Normalplasma des Instituts minus der zweifachen Standardabweichung, obwohl bei vier von diesen von den Herstellern eine Aktivität im Normalbereich angegeben wurde. Man muß annehmen, daß die unterschiedlichen Aktivitäten der verschiedenen Normalplasmen für diese Abweichungen verantwortlich sind.

2. Nur sechs der zwölf Kontrollplasmen für den pathologischen Bereich der Thromboplastinzeitbestimmung treffen den therapeutischen Bereich. Bei nur zwei der elf Kontrollplasmen mit Zielangaben werden diese tatsächlich erreicht; ein Plasma weist eine höhere, die anderen acht eine niedrigere Aktivität auf. Für diese Abweichungen sind die unterschiedlichen Aktivitäten der Normalplasmen, die Diskrepanzen in den Eichkurven durch verschiedene Verdünnungsmedien sowie die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der benutzten Thromboplastine anzuschuldigen.

3. Nur bei drei von fünfzehn Kontrollplasmen mit Zielwertangaben für die partielle Thromboplastinzeit ist eine Gerinnungszeit außerhalb des angegebenen Bereichs gemessen worden. Bei einem der acht untersuchten Qualitätskontrollplasmen für die Thrombinzeitbestimmung wurde eine Gerinnungszeit gemessen, die nicht mit dem Zielwert übereinstimmte. Dies konnte durch eine andere Thrombinaktivität im Testansatz der Methode erklärt werden, auf die sich die Zielangabe bezog.

4. Die Qualitätskontrollplasmen, die vom Hersteller zur Kontrolle der Aktivitätsbestimmungen der Faktoren II, V, VII und X empfohlen werden, besitzen bis auf eine Ausnahme keine genaue Zielangaben. Stattdessen werden grobe Umschreibungen der Sollaktivität angegeben. Ohne präzise Angaben der Sollaktivität sind diese Kontrollplasmen für die Richtigkeitskontrolle ungeeignet.

5. Die gemessenen Aktivitäten der Qualitätskontrollplasmen für die Faktoren VIII und IX werden auf Internationale Standards bezogen. Für die meisten Plasmen finden sich genaue Angaben der Sollaktivität, die für bestimmte Untersuchungsmethoden angegeben sind. Die Zielbereiche werden in den meisten Fällen nicht getroffen. Bei einem Plasma wird eine Faktor-VIII-Aktivität von 1,8 IU/ml gemessen, obwohl für dieses 1,1 IU/ml für die Methode des Plasmaherstellers angegeben waren. Wegen solcher Abweichungen sind diese Kontrollplasmen zur Qualitätskontrolle der Diagnostik der Hämophilie A und B ungeeignet, da eine genaue Erfassung des Schweregrades der Erkrankung nicht möglich ist und außerdem eine sichere Kontrolle der Substitutionsbehandlung nicht gegeben ist.

6. Nur bei zwei der neun Plasmen, deren Fibrinogenkonzentration angegeben ist, wird eine Konzentration gemessen, die in den Zielbereich fällt. Bei den sieben anderen Kontrollplasmen werden Fibrinogenkonzentrationen gemessen, die um bis zu 1,0 g/l höher sind als die deklarierten Konzentrationen. Die Zielangaben der Plasmen beziehen sich auf die gerinnungsphysiologische Methode nach Clauss, während die Meßwerte durch die radiale Immundiffusion ermittelt wurden. Die meisten der untersuchten Plasmen sind wegen dieser Diskrepanzen für eine Kontrolle der Fibrinogenbestimmung ungeeignet.

7. Eines der untersuchten Qualitätskontrollplasmen wird Kontrolle der Bestimmung der Antithrombin-III-Aktivität eingesetzt. Es findet sich eine Diskrepanz zwischen ausgewiesener und gemessener Aktivität.

8. Aus der Untersuchung der klinisch-chemischen Parameter der Kontrollplasmen läßt sich ableiten, daß viele Plasmen verdünnt wurden (niedrige Proteinkonzentrationen). 21 Qualitätskontrollplasmen weisen sehr hohe Osmolalitäten auf (448 bis 914 mosmol/kg H_2O). Bei zwei Plasmen liegen die pH-Werte über 8,0. Diese Eigenschaften widersprechen der Forderung der Bundesärztekammer <4>, daß Kontrollmaterialien dem Untersuchungsgut möglichst ähnlich sein müssen.

Ein Qualitätskontrollplasma für Blutgerinnungsanalysen soll folgende Eigenschaften haben:

- humanes Plasma
- den zu analysierenden Citratplasmen möglichst ähnlich
- mit Puffer (Hepes) eingestellt auf einen pH = 7,0 - 7,6
- Osmolalität kleiner 330 mosmol/kg H_2O
- Natriumkonzentration kleiner 180 mmol/l
- präzise Angaben der Sollwerte
- Eichung mit Internationalen Standards und dem Referenzplasma nach DIN 58.939 Teil 1 für die Thromboplastinzeitbestimmung
- Prüfung der Qualitätskontrollplasmen durch ein nationales Referenzlaboratorium

7. Literaturverzeichnis

1 Averdunk, R. und J. S. Braun
Die partielle Thromboplastinzeit
aus: Blut; Band 24, Seite 372 - 381 (1972)

2 Averdunk, R. und J. S. Braun
Über die Aktivität von Reagenzien zur Thromboplastinzeit-Bestimmung (Quick-Wert) verschiedener Hersteller bei Konzentrationsänderungen einzelner Gerinnungsfaktoren
aus: Blut; Band 24, Seite 303 - 313 (1972)

3 Averdunk, R. und J. Grüner
Einfluß von Vorstufen von Faktor II oder Faktor X auf den Quick-Wert bei Verwendung von Thromboplastinen verschiedener Hersteller
aus: Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry; Volume 19, pp. 89 - 97 (1981)

4 BÄK, Bundesärztekammer
Richlinien der Bundesärztekammer zur Durchführung der statistischen Qualitätskontrolle und von Ringversuchen im Bereich der Heilkunde
aus: Deutsches Ärzteblatt; 71. Jahrgang, Seite 961 - 965 (1974)

5 BÄK, Bundesärztekammer
Ausführungsbestimmungen und Erläuterungen zur Durchführung der statistischen Qualitätskontrolle und von Ringversuchen im Bereich der Heilkunde
aus: Deutsches Ärzteblatt; 68. Jahrgang, Seite 2228 - 2231 (1971)

6 BÄK, Bundesärztekammer
Statistische Qualitätskontrolle und Ringversuche im Bereich der Heilkunde
aus: Deutsches Ärzteblatt; 71. Jahrgang, Seite 911 - 912 (1974)

7 Bangham, D. R., R. Biggs, M. Brozovíc, K. W. E. Denson und J. L. Skegg
A Biological Standard for Measurement of Blood Coagulation Factor VIII Activity
aus: Bulletin of the World Health Organization; Volume 45, pp. 337 - 351 (1971)

8 Barrowcliffe, T. W. und T. W. L. Kirkwood
An International Collaborative Assay of Factor VIII Clotting Activity
aus: Thrombosis and Haemostasis; Volume 40, pp. 260 - 271 (1978)

9 Beeser, H.
Qualitätssicherung hämostaseologischer Untersuchungsmethoden
aus: Medizinisches Laboratorium; Band 29, Seite 262 - 270 (1976)

10 Beeser, H.
Qualitätskontrolle gerinnungsphysiologischer Untersuchungsmethoden
aus: Methodische Fortschritte im medizinischen Laboratorium von A. Englhardt und H. Lommel,
Band 4: Diagnostik hämorrhagischer Diathesen;
Verlag Chemie (Weinheim - New York), 1977

11 Beeser, H. und J. Fischer
Die Rolle eines Referenzplasmas bei der Standardisierung der Thromboplastinzeit und anderer Gerinnungstests
aus: Fibrinolyse, Thrombose, Hämostase von E. Deutsch und K. Lechner; Seite 429 - 431, Schattauer Verlag (Stuttgart), 1980

12 Beeser, H., R. Merten, H. Drescher und J. Fischer
A German Prothrombin Time Proficiency Testing Program
aus: Thrombosis et Diathesis haemorrhagica; Volume 33, pp. 152 - 154 (1975)

13 Bigelow, F. S.
The Influence of pH on Blood Coagulation
aus: American Society for Clinical Investigations; Volume 30, page 629 (1951)

14 Biggs, R.
The Treatment of Haemophilia A and B and von Willebrand's Disease, pp. 30 - 31
Blackwell Scientific Publikations, Oxford; 1978

15 Brozovíc, M., T. B. L. Kirkwood and I. Robertson
Study of a Proposed International Standard for Blood Coagulation Factor IX
aus: Thrombosis and Haemostasis; Volume 35, pp. 222 - 236 (1976)

16 Büttner, H.
Statistische Qualitätskontrolle in der Klinischen Chemie - Theoretische Grundlagen und praktische Durchführung
aus: Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie; 5. Jahrgang, Seite 41 - 46 (1967)

17 Chak, I. M., und K. V. Giri
Effect of Ultrafiltration and Carbon Dioxide on the Prothrombin Activity of Plasma
aus: Nature; Volume 159, pp. 878 - 879

18 Clauss, A.
Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens
aus: Acta haematologica; Volume 17, Seite 237 - 246

19 DIN, Deutsches Institut für Normung e. V.
DIN-Norm 58.936 Teil 3
aus: DIN-Taschenbuch 101, Medizin 2
Beuth-Verlag GmbH (Berlin, Köln), 1976

20 DIN, Deutsches Institut für Normung e. V.
DIN-Norm 58.939 Teil 1, Referenzplasma

21 Drescher, K. H.
Qualitätskontrolle bei Gerinnungsuntersuchungen
aus: Das Ärztliche Laboratorium; 15. Jahrgang, Seite 245 - 259 (1969)

22 Fischer, M.
Praktische Möglichkeiten der Laboratoriumskontrolle der klassischen Antikoagulantientherapie
aus: Klinische und ambulante Anwendung klassischer Antikoagulantien (XX. Hamburger Symposium über Blutgerinnung), herausgegeben von R. Marx und A. Thies, Seite 73 - 87, Schattauer Verlag

23 Fraser, C. G. und M. J. Peake
Problems associated with Clinical Chemistry Quality Control Materials
aus: Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, Volume 12, pp. 59 - 86 (1980)

24 Haeckel, R.
Qualitätssicherung im medizinischen Labor
Deutscher Ärzte Verlag (Köln), 1975

25 Hendry, E. B.
Osmolarity of Human Serum and of Chemical Solutions of Biologic Importance
aus: Clinical Chemistry; Volume 7, pp. 156 - 164 (1961)

26 Hesse, R., W. Tritschler, C. Castelfranchi und W. Bablok
Antithrombin III: Referenzwerte mit einem chromogenen Substrat (Chromozym TH)
aus: Thrombosis and Haemostasis; Seite 10 - 15 (1980)

27 Hoffmann, J. J. M. L., und P. N. Meulendijk
Comparison of Reagents for Determing the Activated Partial Thromboplastin Time
aus: Thrombosis and Haemostasis; Volume 39, pp. 640 - 645 (1978)

28 Ingram, G. I. C., P. F. o'Brien und W. R. S. North
The ICTH/WFH Study of the Partial Thromboplastin Time in Mild Haemophilia
aus: Scandinavian Journal of Haematology; Supplement 37, Volume 25, pp. 64 - 72 (1980)

29 Jaroschik, K. und S. Nägle
Untersuchungen zur Vergleichbarkeit von Quick-Werten
aus: Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie; 11. Jahrgang, Seite 107 - 113 (1973)

30 Kirkwood, T. B. L., T. W. Barrowcliffe und D. P. Thomas
An International Collaborative Study Establishing a Reference Preparation for Antithrombin III
aus: Thrombosis and Haemostasis; Volume 43, pp. 10 - 15 (1980)

31 Kirkwood, T. B. L., P. J. Campbell, P. J. Gaffney
A Standard for Human Plasmin
Thrombosis et Diathesis haemorrhagica; Volume 34, pp. 20 - 31 (1975)

32 Koepke, J. A.
Standardization of Fibrinogen Assays
aus: Scandinavian Journal of Haematology; Supplement 37, Volume 25, pp. 130 - 139 (1980)

33 Knoll, C.
Die Beeinflußung der Blutgerinnung durch den pH-Wert des Blutes
Inaugural-Dissertation der Universität Tübingen

34 Louderback, A. L.
International Criteria for Diagnostic Material
aus: Quality Control in Clinical Chemistry - Transactions of the VIth International Symposium in Geneva; April, 23 - 25, 1975 von G. Anido u. a., pp. 385 - 395; Walter de Gruyter, Berlin (1975)

35 Mancini, G., A. O. Carbonara und J. F. Heremans
Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immundiffusion
aus: Immunochemistry; Volume 2, pp. 235 - 254 (1965)

36 Meyer-Bertenrath, J. G.
Blutgerinnung und Fibrinolyse
5. Auflage
Deutscher Ärzte Verlag (Köln), 1980

37 Meyer-Bertenrath, J. G.
Leitfaden der Labormedizin
2. Auflage
Deutscher Ärzte Verlag (Köln), 1978

38 Miale, J. B. und F. A. Loeliger
"Reference Plasmas" in the Laboratory Control of Oral Anticoagulants
aus: Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica; Volume 33, pp. 163 - 164 (1975)

39 Paar, D.
Qualitätssicherung im Gerinnungslabor unter besonderer Berücksichtigung der konventionellen Methoden zur Kontrolle der oralen Antikoagulantientherapie
aus: Das Medizinische Laboratorium; 34. Jahrgang, Seite 83 - 87 (1981)

40 Pilgerstorfer, H. W. und H. Stych
Vergleich verschiedener Standardplasmen zur Bestimmung der Einphasen-Thromboplastinzeit nach Quick
aus: Fortschritte der Klinischen Chemie: Enzyme und Hormone, aus dem angeschlossenen Kapitel über Qualitätskontrolle im Gerinnungslaboratorium, herausgegeben von E. Kaiser; Wien, Medizinische Akademie (1972), Seite 397 - 404

41 Poller, L.
Standardization of the APTT Test: Current Status
aus: Scandinavian Journal of Haematology; Supplement 37, Volume 25, pp. 49 - 63

42 Poller, L. und G. I. C. Ingram
Standardization and Quality Control of Anticoagulant Therapy
aus: Quality Control in Haematology von S. M. Lewis und S. F. Coster; Academic Press (London), pp. 153 - 169 (1975)

43 Richterich, R. und J. M. Colombo
Klinische Chemie; Theorie, Praxis, Interpretation
4. Auflage
Verlag Karger (Basel), 1978

44 Rick, W.
Klinische Chemie und Mikroskopie
5. Auflage
Springer Verlag (Berlin, Heidelberg, New York), 1977

45 Robertson, I., B. J. Gaffney und D. R. Bangham
International Committee Business: Standard for Human Thrombin
aus: Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica; Volume 34, pp. 1 - 19 (1975); Sonderdruck

46 Rogner, G.
Untersuchungen zum sogenannten "Normalwert" bei der Gerinnungsanalyse
aus: Folia haematologica; Band 97, Seite 211 - 222 (1971)

47 Schroll, A.
Meßmethoden in der Gerinnungsanalytik: Vergleich von Thromboplastinpräparaten
aus: Diagnostik; 10. Jahrgang, Seite 202 - 206 (1977)

48 Scully, R. E. und B. U. McNeely
Case Records of the Massachusetts General Hospital
aus: The New England Journal of Medicine; Volume 302, pp. 37 - 48 (1980)

49 Soloway, H. B., B. M. Cornett und J. W. Grayson
Comparison of Various Activated Partial Thromboplastins in the Laboratory Control of Heparin Therapy
aus: The American Journal of Clinical Pathology; Volume 59, pp. 587 - 590 (1973)

50 Sommer, R. und W. Hohenwallner
Ein Beitrag zur Qualitätskontrolle von Gerinnungsanalysen
aus: Wiener Klinische Wochenschrift; 88. Jahrgang, Seite 19 - 25 (1976)

51 Thomson, J. M.
Laboratory Control of Anticoagulant Therapy
aus: Blood Coagulation and Haemostasis; vom gleichen Autor, Second Edition
Churchill Livingstone (Edinburgh, London, New York), 1980

52 Witt, I.
Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse
Verlag Chemie (Weinheim), 1975

53 Zöller, H., W. Gross und E. Moll
Statistische Qualitätssicherung gerinnungsanalytischer Meßgrößen
aus: Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie; 13. Jahrgang; Seite 75 - 77 (1975)

54 Zucker, S., M. H. Cathey und R. West
Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation
aus: American Journal of Clinical Pathology; Volume 53, pp. 924 - 927 (1970)

Herrn Prof. Dr. H. Trobisch danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Laborplatzes sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. O. Richter gilt mein Dank für die Übernahme des Korreferates.

L e b e n s l a u f

23.04.1957	als Sohn der Eheleute Kurt Gebhardt und Maria Gebhardt, geb. Guß, in Homberg/Niederrhein geboren
Ostern 1964	Einschulung in die katholische Volksschule an der Marienstraße in Homberg/Niederrhein
Sommer 1966	Wechsel an die Gemeinschaftsschule an der Werthauser Straße in Rheinhausen
Herbst 1967	Wechsel auf das Städtische mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Rheinhausen
Sommer 1976	Abitur am selben Gymnasium abgelegt, das in Krupp-Gymnasium umbenannt worden war
WS 1976/77	Beginn des Studiums der Chemie an der Universität Düsseldorf
SS 1977	Wechsel in das Medizinstudium an der Universität Düsseldorf
20.03.1979	Ärztliche Vorprüfung in Düsseldorf bestanden
20.03.1980	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf abgelegt
20.08.1982	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf abgelegt
Herbst 1982	Beginn des Praktischen Jahres am St.-Johannes-Hospital in Duisburg-Hamborn (Lehrkrankenhaus der Universität Düsseldorf

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen